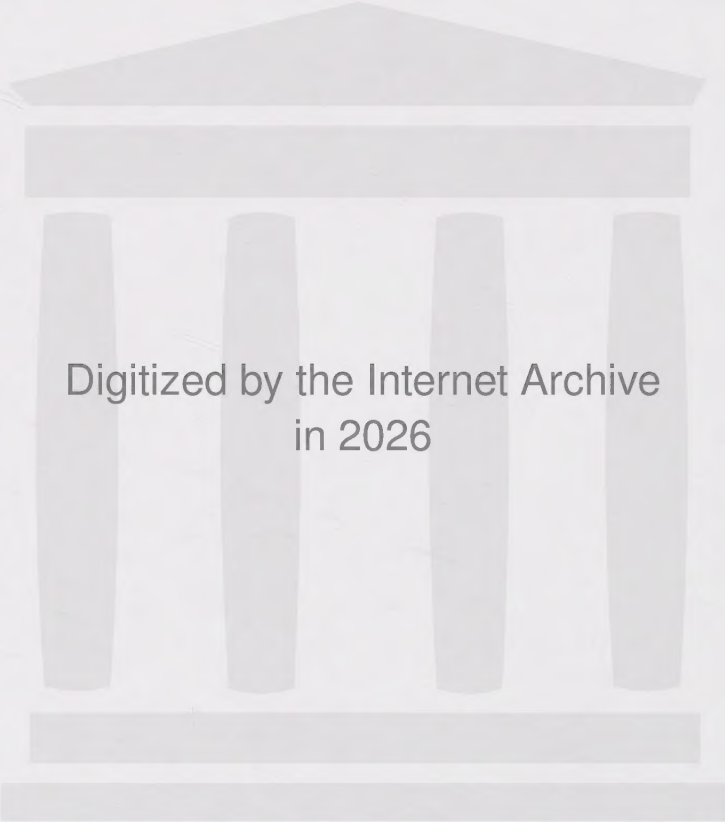


**UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHKEIT
DER AKTIVEN UND PASSIVEN
IMMUNISIERUNG GEGEN TRICHOTHECENE
AM BEISPIEL VON DIACETOXYSCIRPENOL**

Ernst Hatz

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Untersuchungen zur Möglichkeit der aktiven und passiven
Immunisierung gegen Trichothecene am Beispiel von
Diacetoxyscirpenol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

von

Ernst Hatz

aus

München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv.Doiz. Dr. Dr.habil. J. Bauer

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung
2	Schrifttum
2.1	Allgemeines über Trichothecene; sowie Vorkommen, Aufbau und physikalisch-chemische Eigenschaften von DAS
2.2	Biologische Eigenschaften der Trichothecene
2.3	Toxische Wirkungen von DAS
2.3.1	Verdauungstrakt
2.3.2	Blutbildende Organe
2.3.3	Genitaltrakt
2.3.4	Haut
2.4	Immunsuppressive Wirkungen von DAS
2.5	Metabolisierung von DAS im Säugetierorganismus
2.6	Nachweisverfahren
2.6.1	Physikalisch-chemische Nachweisverfahren
2.6.2	Biologische Nachweisverfahren
2.6.3	Immunologische Nachweisverfahren
2.7	Immunisierung gegen DAS
2.8	Aktive Immunisierung; Passive Immunisierung
3	Eigene Untersuchungen
3.1	Ermittlung von LD Werten bei oraler Toxinapplikation
3.1.1	Material
3.1.2	Methodik
3.1.3	Ergebnisse
3.1.3.1	Klinische Befunde
3.1.3.2	Pathologisch-anatomische Befunde
3.1.3.3	LD-Werte bei oraler Toxinapplikation
3.2	Ermittlung von LD Werten bei intravenöser Toxinapplikation
3.2.1	Material
3.2.2	Methodik

3.2.3	Ergebnisse	26
3.2.3.1	Vorversuch	26
3.2.3.2	Hauptversuch	26
3.3	Antigene und Antigenherstellung	28
3.3.1	Material	28
3.3.2	Methodik	29
3.3.2.1	Herstellung eines zur Kopplung an einen Protein- träger befähigten Toxinderivates	29
3.3.2.2	Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Umsetzung	29
3.3.2.3	Kopplung des Toxinderivates an einen Proteinträger	30
3.3.3	Ergebnisse	30
3.4	Vorversuch zur aktiven Immunisierung gegen DAS	30
3.4.1	Material	30
3.4.2	Methodik	32
3.4.2.1	Nachweis der Antikörper mittels Doppel - Antikörper- technik im ELISA	33
3.4.3	Ergebnisse der Antikörpertiterbestimmung	34
3.5	Hauptversuch der aktiven Immunisierung gegen DAS	37
3.5.1	Material	37
3.5.2	Methodik	37
3.5.3	Ergebnisse	38
3.5.4	Empfindlichkeit der Antiseren gegen DAS	43
3.5.5	Ergebnisse	43
3.5.6	Bestimmung sekretorischer Antikörper aus Darmspülproben	45
3.5.7	Ergebnisse	46
3.5.8	Orale Belastung aktiv immunisierter Tiere aus dem Vor- und Hauptversuch mit DAS	46
3.5.9	Ergebnisse der Belastungsversuche	46
3.6	Passive Immunisierung gegen DAS mit heterologem Antiserum (Kaninchen anti-DAS-Serum)	48
3.6.1	Material	48
3.6.2	Methodik	48
3.6.2.1	Immunisierung von Kaninchen gegen DAS	48
3.6.2.2	Reinigung eines Kaninchen anti-DAS-Serums mittels Affinitätschromatographie	49

3.6.2.2.1	Herstellung einer mit anti-Kaninchen IgG beschichteten Säule	49
3.6.2.2.2	Reinigung des Kaninchen anti-DAS Serums	50
3.6.2.3	Ermittlung des IgG-Gehalts der isolierten Antikörper	50
3.6.2.4	Belastungsversuche nach passiver Immunisierung	53
3.6.2.5	Ergebnisse	53
3.7	Passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern	54
3.7.1	Material	54
3.7.2	Methodik	54
3.7.2.1	Aufbereitung des Ascites	54
3.7.2.2	Bestimmung des IgG ₁ Anteils des aufbereiteten Ascites	55
3.7.2.3	Ergebnisse	55
3.7.2.4	Neutralisationstest des monoklonalen Antikörpers	55
3.7.2.5	Passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper und nachfolgende i.v. Belastung	56
3.7.2.6	Ergebnisse	56
3.7.2.6.1	Neutralisationstest des monoklonalen Antikörpers	56
3.7.2.6.2	Passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper und nachfolgende i.v. Belastung	56
3.8	Schutzwirkung der aktiven Immunisierung gegen DAS gegenüber Hauteinwirkung des Toxins	58
3.8.1	Material	58
3.8.2	Methodik	58
3.8.3	Ergebnisse	60
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung/Summary	67
6	Literatur	69

1 Einleitung

Trichothecene haben in den letzten Jahren, nicht zuletzt auf Grund verbesserter Analysenverfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis dieser Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, an Bedeutung gewonnen. Die Zunahme der Berichte über Schäden durch Mykotoxine in landwirtschaftlichen Tierhaltungen einerseits und die Möglichkeit, diese Haptene an Trägerproteine gekoppelt als Immunogene einzusetzen, haben auch Überlegungen zur Immunisierung gegen diese Toxine angeregt (BARNIKOL et al., 1982). Am Institut werden seit etwa zehn Jahren Immunogene zur Produktion von Antikörpern gegen Mykotoxine hergestellt, die bei enzymimmunologischen Nachweisen für diese Toxine verwendet werden (BIERMANN und TERPLAN, 1980; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985; ESGIN 1987; KLAFFER 1988; MÄRTLBAUER et al., 1988).

Der Rahmen dieser Erfahrungen sollte am Beispiel von Diacetylscirpenol (DAS) zu orientierenden Untersuchungen über die aktive und passive Immunisierung genutzt werden. Für letztere standen polyklonale und monoklonale Antiseren zur Verfügung. Die immunisierten Tiere sollten experimentell mit DAS belastet werden, wobei neben der oralen und parenteralen Applikation auch die Hautkontamination vorgesehen wurde.

Da in der Literatur keine für die entsprechenden Versuche an Mäusen erforderlichen Toxizitätswerte beschrieben sind, mußten auch LD-Werte für orale und intravenöse Verabreichungen ermittelt werden.

2. Schrifttum

2.1 Allgemeines über Trichothecene; sowie Vorkommen, Aufbau und physikalisch-chemische Eigenschaften von DAS

FREEMANN und MORRISON isolierten 1948 aus einer Kultur von *Trichothecium roseum* eine antimykotisch wirksame Substanz, die sie Trichothecin nannten. Später ergab sich aus der Bezeichnung dieser Substanz der Name für eine größere Gruppe von Schimmelpilzgiften, den Trichothecen.

Trichothecene sind eine chemisch verwandte Gruppe von biologisch aktiven sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen aus der Gruppe der Fungi imperfecti (UENO, 1977). Fusarienarten stellen dabei den Hauptanteil der Toxinbildner. Sie kommen in den verschiedensten Bodenarten in allen Regionen der Welt vor und leben als Pflanzensaprobionten. Bei Mensch und Tier verursachen sie Mykotoxikosen, vorwiegend nach Aufnahme verschimmelter Getreideprodukte (PALTI, 1978).

1971 wurde durch den Ausbruch einer Intoxikation durch verpilztes Getreide (Moldy Corn Toxicosis) bei einer Rinderherde in Wisconsin (USA) das allgemeine Interesse auf die Trichothecene gerichtet. Eine hochgradige Kontamination des Futters mit *Fusarium tricinctum* und seines Metaboliten T 2 Toxin konnte nachgewiesen werden (HSU et al., 1972).

Seit dieser Zeit wurden die Bemühungen intensiviert, über Vorkommen und die toxikologischen Wirkungen der Trichothecene genauere Kenntnisse zu erlangen.

Die Trichothecene stellen eine Gruppe von Verbindungen dar, die zur Stoffklasse der Sesquiterpenoide gehören und ein tetrazyklisches Trichothecan-Gerüst aufweisen.

Fast alle natürlich vorkommenden Trichothecene weisen zwischen dem C-12 und C-13 Atom eine Epoxygruppe und eine olefinische Bindung bei C-9 und C-10 auf und sind als 12,13 Epoxytrichothec-9-ene charakterisiert (GODFREYSEN et al., 1967). Längeres Kochen in Wasser, stark saures Milieu (pH 3) sowie Reduktion mit LiAlH_4 öffnen den Epoxidring. Dies führt zu einem partiellen Verlust der biologischen Eigenschaften (BAMBURG et al. 1969).

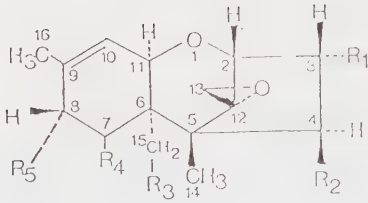
Trichothecene lösen sich gut in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Aceton und Methanol, wobei polaritätsabhängige Unterschiede bestehen. In Wasser zeigen Trichothecene schlechte Löslichkeit (PATHRE und MIROCHA, 1977).

Nach UENO (1980) erfolgt die Einteilung der Trichothecene in die Gruppen A, B, C und D. Gruppe A unterscheidet sich von Gruppe B nur durch das Vorhandensein einer Ketogruppe am C-8 Atom. Die Trichothecene der Gruppe C sind durch zwei Epoxydgruppen und die Trichothecene der Gruppe D durch ein makrozyclisches Ringsystem, das an R ein großes Kohlenstoff-Sauerstoff-Ringsystem aufweist, charakterisiert (vgl. Abb.1 und Tab.1).

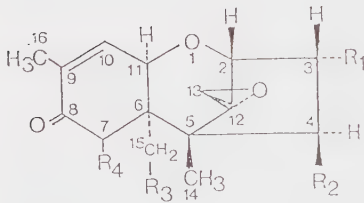
Diacetoxyscirpenol (DAS) weist ein Trichothecangrundgerüst mit vier Methylgruppen und einem trizyclischem Skelett aus Cyclohexan, Cyclopentan und einem sechsgliedrigen Oxyran auf.

UENO (1983) ordnete es in die Gruppe A ein. DAS wurde erst 1961 von BRIAN et al. aus *Fusarium scirpi* isoliert. Der Name leitet sich aus dem Gattungsnamen des Pilzes und den zwei Acetylgruppen des Moleküls her. DAS bildet farblose optisch aktive Kristalle. Das Molekulargewicht wurde mit 366,42 Dalton bestimmt, der Schmelzpunkt liegt bei 162 - 164° C. Die Summenformel lautet $C_{19}H_{26}O_7$ (LÖFFLER et al. 1965). Da DAS keine konjugierten Doppelbindungen aufweist, zeigt es keine Absorption im langwelligen UV-Licht und im sichtbaren Wellenbereich, was die sichtbare Detektion ohne vorherige Derivatisierung praktisch unmöglich macht.

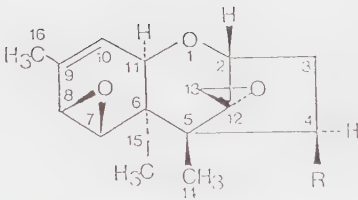




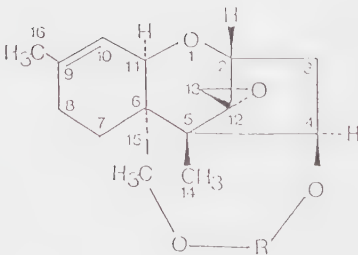
Gruppe A



Gruppe B



Gruppe C



Gruppe D

Abbildung 1: Chemische Struktur der 12,13 Epoxytrichothec-9-ene

Tab.1: Einteilung der Trichothecene nach strukturellen Gruppen

Gruppe A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Trichothecene (scirpene)	H	H	H	H	H
Trichodermol	H	OH	H	H	H
Verrucarol	H	OH	OH	H	H
Scirpentriol	OH	OH	OH	H	H
T 2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
Trichodermin	OH	OAc	H	H	H
Monoacetoxyscirpenol	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxyscirpenol (<u>DAS</u>)	OH	OAc	OH	H	H
T 2 toxin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Gruppe B	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Trichothecin	H	OCOCH=CHCH ₃	H	H
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH

Gruppe C	R
Crotocol	OH
Crotocin	OCOCH=CHCH ₃

Gruppe D	R (makrozyklischer Ring)
Verrucarine	Roridine
Satratoxine	Vertisporin

2.2 Biologische Eigenschaften der Trichothecene

Trichothecene sind Produkte des sekundären Stoffwechsels von Fungi imperfecti der Gattungen *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* und *Stachyobotrys*. Sie zeigen ein charakteristisches Spektrum biologischer Eigenschaften: Hierzu gehören die Zerstörung von Thymus und Lymphknoten sowie der Proliferationszellen von Milz und haematopoetischem Gewebe. (SAITO und OHTSUBO, 1974; BAMBURG und STRONG, 1971). 12,13 Epoxytrichothecene gehören nach UENO (1973) zu den Substanzen, die die Proteinsynthese in tierischen Zellen am stärksten hemmen. Sie zeichnen sich auf Grund ihres negativen Einflusses auf die Protein- und DNA-Synthese von eukaryontischen Zellen als stark cytotoxisch aus, wobei die Öffnung des Epoxidringes zu einem teilweisen Verlust der biologischen Aktivität führt (UENO, 1977). Nach MIROCHA (1977) tragen auch die Seitenketten zur biologischen Aktivität bei.

Verschiedene Autoren haben sich mit der Hemmung der Proteinbiosynthese durch die Trichothecene beschäftigt. Im Gegensatz zu dem Mykotoxin Aflatoxin B₁ weist die Hemmung der Proteinsynthese durch Trichothecene keinen biphasischen Verlauf auf (McLAUGHLIN et al., 1977). Untersuchungen an Kaninchen-Retikulozyten und an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen mit Nivalenol gaben erste Hinweise, daß durch dieses Trichothecen eine direkte Wirkung auf die Ribosomenfunktion ausgeübt wird (UENO und FUKUSHIMA, 1968). Polyribosomenprofile, die im Dichtegradientenverfahren von Zellen nach Zugabe verschiedener Trichothecene gewonnen wurden, lassen darauf schließen, daß diese Mykotoxine sowohl den Beginn der Proteinsynthese, als auch den Elongations- bzw. Ablöseschritt hemmen können (CUNDLIFF et al. 1974; LIAO et al., 1976; WEI et al., 1974).

Nach einer Zusammenstellung von UENO (1983) ist bisher von 18 Trichothecen bekannt, welchen Schritt der Proteinsynthese sie hemmen (siehe Tab.2).

Mit radioaktiv markierten Trichodermin konnte nachgewiesen werden, daß sich dieses Mykotoxin an die S60 Untereinheiten von Ribosomen anlagert und gleichzeitig eine Hemmung der Peptidyl-transferase erfolgt (WEI et al., 1974).

Nach CUNDLIFFE et al. (1974) treten bei mit Trichothecenen behandelten Tieren als erstes Zellläsionen an den proliferierenden Zellen der Gastrointestinalschleimhäute, dem Knochenmark und der Milz auf. Charakteristisch ist eine Verzögerung von mehreren Stunden bis zum Auftritt sichtbarer Toxizitätssymptome. Zellen in Gewebekulturen zeigen unter Trichothecenanwesenheit chromosomale Aberrationen, die für eine Störung der Mitose sprechen. CUNDLIFFE et al. vermuten, daß der genaue Hemmechanismus in einer Abhängigkeit von den Substituenten am C-15 Atom steht und DAS über eine Öffnung des Epoxidringes die Initiation der Polypeptidkette hemmt.

WEI und McLAUGHLIN (1974) wiesen nach, daß die unterschiedliche Molekülstruktur der Epoxytrichothecene dafür verantwortlich ist, welche Phase der Proteinsynthese gehemmt wird.

Nach ihrer Ansicht ist die Hydroxygruppe am C-3 Atom (R-1) des DAS-Moleküls und der den Sauerstoff enthaltende Substituent am C-15 Atom für die Beeinflussung der Proteinsynthese verantwortlich. Durch die Proteinsynthesehemmung kommt es zu einer verringerten DNS-Bildung. Die RNS-Bildung wird von DAS dagegen nicht beeinflußt.

DAS besitzt nur geringe antibakterielle und antimykotische Eigenschaften. So konnten nach BRIAN et al. (1961) 100 µg DAS/ml Medium die Keimung der Sporen von Schimmelpilzen verschiedener Gattungen, mit Ausnahme von *Penicillium digitatum*, nicht verhindern.

Tabelle 2: Hemmung der Proteinsynthese durch Trichothecene
(nach UENO, 1983)

Trichothecen	ED ₅₀ (µg/ml) ⁺	Art der Hemmung
T-2 Toxin	0,03	I ⁺⁺
HT-2 Toxin	0,03	I
Diacetoxyscirpenol	0,03	I
Monoacetoxyscirpenol		I
Trichodermin		ET ⁺⁺⁺
Calonectrin	ca. 5	I
15-Deacetylcalonectrin	ca. 20	ET
Trichothecolon	20,0	ET
Trichodermol E		ET
Verrucarol		ET
Nivalenol	3,0	I
Fusarenon X	0,25	I
Deoxynivalenol	2,0	ET
Trichothecin	0,15	ET
Crotocin	1,0	ET
Roridin H		I
Verrucarin A	0,01	I
Verrucarin J		I

¹ED₅₀ : Effektive Dosis geprüft im Kaninchen-Retikulozyten-Test

⁺⁺I : Hemmung des Beginns der Proteinsynthese

⁺⁺⁺ET : Hemmung der Aufrechterhaltung bzw. Beendigung der Proteinsynthese

2.3 Toxische Wirkungen von DAS

WORONIN berichte bereits 1891 von einer "Tauselgetreidetoxikose", bei welcher der Verzehr von Brot, das mit verschimmeltem Getreide gebacken war, Kopfschmerz, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen hervorrief. Die allgemeinen Anzeichen einer Trichothecen-vergiftung sind: Übelkeit, Erbrechen, Entzündungen und Blutungen der Magen- und Darmschleimhäute, Futterverweigerung, Durchfall, Veränderungen des Blutbildes, nervöse Störungen und Zerstörung des Knochenmarkes. Da die histopathologischen Veränderungen dem Bild eines Strahlenunfalls entsprechen, bei dem in der Hauptsache die Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Milz und des Knochenmarkes geschädigt werden, wird auch von einem radiomimetischen Effekt der Trichothecene gesprochen (UENO, 1983). Eine Übersicht über die durch Trichothecene verursachten Toxikosen gibt nach UENO (1977 b) Tab.3 wieder.

LD₅₀ Dosen für DAS bei verschiedenen Tierarten sind in Tab.4 festgehalten. STÄHELIN et al. (1968) führten als erste Untersuchungen über die Toxizität von Anguidin (DAS) bei intracutaner, subcutaner und intravenöser Applikation durch. Bei einer einmaligen intravenösen Injektion zur Ermittlung der letalen Dosis bei Maus, Ratte, Kaninchen und Hund zeigten die Tiere Apathie, verlangsamte Atmung, Zyanose, Diarrhoe, blutigen Stuhl, Erbrechen, Tremor und Tachykardie. Bei chronischer Intoxikation mit DAS traten bei Ratten Gewichtsverlust, Hämaturie und Diarrhoe auf. Schweine zeigten bei intravenöser DAS Applikation schon nach zwanzig Minuten Erbrechen und Lethargie. Ab der sechsten Stunde nach der Verabreichung zeigten sich Bewegungsstörungen und Nachhandparesen (WEAVER et al., 1978).

Junge Organismen sind gegen DAS empfindlicher als adulte, wobei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb einer Art bestehen (UENO, 1977).

Tabelle 3: Durch Trichothecene verursachte Toxikosen (nach Ueno
(1977 b))

Toxikose	Ort des Auftretens und betroffene Spezies	Symptome
Taumelgetreide- Toxikose	Sibirien Mensch, Pferd, Schwein, Geflügel	Kopfschmerzen, Übelkeit Schüttelfrost, Erbrechen
Alimentary Toxic Aleukia	UDSSR Mensch, Pferd, Schwein	Erbrechen, Durchfall, Angina, Hautentzündungen, Leukopenie
Stachyobotryotoxikose	Europa Pferd	Schock, Hautnekrosen Leukopenie
Bean-hull Toxicosis	Japan Pferd	Krämpfe, Drehkrankheit
Dendrochoiotoxikose	Europa Pferd	Hautentzündung
Moldy-Corn Toxicosis	USA Schwein, Rind	Erbrechen, Blutungen Futtermittelverweigerung
Red-Mold Toxicosis	Japan Mensch, Pferd, Schwein, Rind	Erbrechen (Mensch.), Durchfall, Abort

ALLEN et al. (1982) verabreichten 36 Wochen alten Leghornhühnern acht Wochen lang 15 ppm DAS. In der Folge sanken Legeleistung, Futterverbrauch, Fruchtbarkeit und Schlupffähigkeit der Küken.

Die toxische Wirkung von DAS gegenüber Protozoen untersuchten UENO und YAMAKWE (1970).

Hiernach konnten bereits 0,05 µg DAS/ml die Zellteilung von *Tetrahymena pyriformis* GL vollständig hemmen.

2.3.1 Verdauungstrakt

Vor allem der Verdauungstrakt ist das wesentliche Zielorgan von 12,13-Epoxytrichotheceninen wie DAS und T 2 Toxin. Bei verschiedenen Tierarten führt DAS bei oraler Aufnahme mit dem Futter zu Nekrosen im Bereich der Lippen bzw. des Schnabels und der Mundhöhle. Ferner werden sowohl nach oraler, als auch nach parenteraler Applikation von DAS Hämorrhagien und Schleimhautnekrosen in Magen und Dünndarm diagnostiziert. So fütterten CHI et al. (1978) einen Tag alte Broilerküken mit einer Diät von 5 ppm DAS. Die Tiere zeigten gelbliche plaqueähnliche Läsionen am Schnabel, an der Zunge und an den Mundwinkeln.

In Tab.5 sind im einzelnen erhobene Befunde unter Angabe von jeweiliger Dosierung, Tierart und Literatur zusammengestellt.

Tabelle 4: LD₅₀ - Dosen (mg/kg KGW) für DAS

Spezies	Applikations- art	Dosis	Literaturangabe
Meerschweinchen	p.o.	2,14	KRIEGLEDER (1980)
Schwein	i.v.	0,376	WEAVER et al. (1978)
Maus	i.v.	12,00	STÄHELIN et al. (1968)
	i.v.	10,00	LÖFFLER et al. (1965)
	i.p.	23,00	UENO et al. (1973)
Ratte	i.v.	1,30	STÄHELIN et al. (1968)
	p.o.	7,30	SIEGFRIED (1977)
	i.p.	0,75	BRIAN et al. (1961)
Hund	i.v.	1,10	STÄHELIN et al. (1968)
Kaninchen	i.v.	1,00	STÄHELIN et al. (1968)
Huhn, 1 Tag alt	p.o.	3,82	CHI et al. (1978)
	7 Tage alt p.o.	5,00	UENO (1980)

p.o. = per os

i.v. = intravenös

i.p. = intraperitoneal

Tabelle 5: Wirkungen von DAS auf den Verdauungstrakt

Tierart	Dosis	Pathologisch-anatomische Befunde	Literatur
Schwein	0,4-0,5 mg/kg KGW i.v	Kongestion in der Mukosa von Jejunum, Ileum und Colon; z.T. Schleimhautläsionen mit fibrinösen Belägen.	WEAVER et al. 1978
Huhn	5,0 mg/kg Futter 3 Wochen	Nekrosen an Schnabel, Schnabelwinkel und Zunge	CHI und MIROCHA 1978
Huhn (7 Tage)	2,7 mg/kg	Nekrose der Mukosa und Atrophie der Villi im Gastro-Intestinal-Trakt	HOERR et al. 1981
Huhn (7 Tage)	2,5-3,0 mg/ KGW p.o. 14 Tage	Ulzera in der Kropfschleimhaut Nekrose in der Intestinalmukosa	HOERR et al. 1982 a
Huhn (7 Tage)	4 mg/kg Futter 21 Tage	Nekrose an Schnabel, Zunge und Gaumen	HOERR et al. 1982 b
Meerschweinchen	4 mg/kg KGW p.o.	Blutungen in der Fundusschleimhaut und Caecumschleimhaut	KRIEGLEDER 1978

2.3.2 Blutbildende Organe

Schädigungen der blutbildenden Organe Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Thymus bzw. Bursa fabricii gehören zu den ausgeprägtesten biologischen Wirkungen der 12,13-Epoxytrichothecene. DAS führt bei verschiedenen Tierarten zu pathologisch-anatomischen Veränderungen in diesen Organsystemen, die im wesentlichen durch Atrophie, Nekrose und Hämorrhagie charakterisiert sind. Diese mikroskopisch feststellbaren Läsionen an den immunologisch bedeutenden Organen spiegeln zum Teil auch die funktionelle Beeinträchtigung der spezifischen und unspezifischen Erregerabwehr wider. So stellten WEAVER et al. (1978) schon bei einer einmaligen intravenösen Applikation von 0,5 mg/kg KGW DAS an Schweine Zellnekrosen in den Mesenteriallymphknoten und eine Hämorrhagie und Nekrose der weißen Pulpa der Milz fest. HOERR et al. (1982 a) berichteten über eine deutlich ausgeprägte Knochenmarksnekrose beim Huhn nach 14 tägiger oraler DAS Verabreichung.

2.3.3 Genitaltrakt

Bei männlichen Tieren führten Trichothecene zu einer Hemmung und Schädigung der Spermatogenese. STÄHELIN et al. (1968) wiesen für DAS beim Hund im Hoden atrophische Störungen mit Reifungshemmung und bei der Ratte eine partielle Tubulusatrophie mit blockierter Spermatogenese nach.

2.3.4 Haut

Trichothecene führen auf Grund ihrer starken Zytotoxizität nach lokaler Applikation zu akuten, unspezifischen Hautentzündungen. Dabei kommt es abhängig von Toxinart und -menge zu Rötung, Schwellung oder Nekrose unterschiedlichen Grades. Diese Veränderungen sind histologisch durch Hyperämie, Ödem und neutrophile Exsudation gekennzeichnet (HAYES und SCHIEFER, 1979).

Alle Trichothecene können nach kutaner Applikation bei allen Spezies von Tieren und beim Menschen lokale Hautreaktionen hervorrufen (SMALLEY und STRONG, 1974). Abhängig von der Dosis entwickelt sich bei Ratten innerhalb weniger Stunden eine ausgedehnte Entzündung der Haut bis zur Ablösung der oberen Hautschichten mit Nekrose (MARASAS et al., 1969).

Nach UENO et al. (1970) erwies sich das Meerschweinchen für einen Hauttest mit Trichothecenen als empfindlichstes Labortier. Im Hauttoxizitätstest können beim Meerschweinchen 0,2 µg DAS/Spot nachgewiesen werden.

Versuche zur Realisation von Hauttumoren bei Mäusen mit DAS (LINDENFELSER et al., 1974) als Kokarzinogene verliefen bisher negativ.

2.4 Immunsuppressive Wirkung von DAS

Häufig zeigen Tiere nach einer Intoxikation mit DAS deutliche Anzeichen einer Immunsuppression, wie erhöhte Infektanfälligkeit und Leukopenie. 1968 stellten STÄHELIN et al. fest, daß an Mäuse intravenös appliziertes DAS schon in subtoxischen Dosen die Bildung von Antikörpern gegen Schafererythrozyten hemmt.

WISKOTT (1978) wies nach, daß DAS (3,0 bzw. 0,5 mg/kg KGW) bei der Maus sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität hemmte.

Diese immunsuppressiven Wirkungen von DAS dürften in erster Linie mit einer Hemmung der Proteinsynthese in Milz, Thymus und Knochenmark zusammenhängen (ROSENSTEIN und LAFARGE-FRAYSSINET, 1983). Nach Untersuchungen von BULLER (1983) liegt der Angriffspunkt für DAS im retikuloendothelialen System. Eine einmalig verabreichte hohe Dosis hemmte die Migration der polymorphkernigen Lymphozyten und schädigte zellgebundene und wandernde Phagozyten. Somit wurde die zellgebundene Abwehr vermindert und die Mortalität bei Mäusen erhöht, die experimentell mit *Listeria monocytogenes* bzw. *Staphylococcus aureus* infiziert worden waren.

2.5 Metabolisierung von DAS im Säugetierorganismus

Über die Metabolisierung von DAS liegen erst seit jüngerer Zeit Untersuchungen vor. BAUER et al. (1985 a,b) wiesen bereits eine halbe Stunde nach einer einmaligen oralen Toxinapplikation an Schweine, im Serum Verbindungen nach, die in den entsprechenden Kontrollseren nicht vorhanden waren. Zunächst waren einheitlich Höchstwerte von DAS, Monoacetoxyscirpenol (MAS) und Scirpentriol (SCT) eine halbe bis zu einer Stunde nach der Toxinapplikation gemessen worden. Die Ergebnisse bezüglich Dauer der Nachweisbarkeit dieser Verbindungen und dem Anteil deacetylierter Metaboliten variierten später im einzelnen stark voneinander. Das quantitative Gesamtergebnis der Blutserumanalysen dieses Versuches ist in Tab.6 dargestellt.

Für den schnellen Abbau von DAS spricht auch, daß bereits im Erbrochenen von Tieren der Metabolit (MAS) festgestellt werden konnte. BAUER (1986) vermutet als mögliche Ursache für diese präsystemische gastrale Transformation sowohl den niedrigen pH-Wert als auch die Aktivität der hydrolytischen Enzyme des Magensaftes.

Aus Resultaten von in vitro-Untersuchungen zum Metabolismus von DAS kann entnommen werden, daß die Deacetylierungsreaktion beim Stoffwechsel dieses Trichothecens eine wesentliche Rolle spielt. So wird DAS durch eine stufenweise Abspaltung von Acetylgruppen zu MAS und SCT transformiert. Nach OTHA et al. (1978) sind an der Deacetylierung vor allem mikrosomale, unspezifische Carboxy-esterasen der S-9 Leberfraktion beteiligt.

KIESSLING et al. (1984) prüften die Umsetzung von DAS durch Mikroorganismen im Pansensaft von Schafen und Rindern. DAS wurde durch die Vormagenflora bereits nach 30 min zu 75% zu MAS deacetyliert. Die Protozoen erwiesen sich hierbei mehr als doppelt so aktiv als die Pansenbakterien.

Tabelle 6:

Konzentrationen ($\bar{x}$) von Diacetoxy-scirpenol (DAS), Monoacetoxy-scirpenol (MAS) und Scirpentriol (SCT) im Blutserum von Schweinen (n=4) nach einmaliger oraler Applikation von DAS (2,0 mg/kg KGW)

Zeitpunkt (h) der Probennahme nach DAS-Verab- reichung	Menge in ng/ml Blutserum		
	DAS	MAS	SCT

0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	9,2	3,7	1,2
1,0	7,9	4,0	4,2
2,0	2,6	2,7	2,4
4,0	1,5	1,1	1,5
6,0	0,6	0,8	1,2
12,0	0,2	1,8	0,2
24,0	0,3	1,0	0,2
48,0	0,0	0,0	0,0

(Tabelle nach Bauer, 1986)

2.6 Nachweisverfahren

Der Nachweis von DAS kann mit Hilfe physikalisch-chemischer, biologischer und seit neuerem auch immunologischer Verfahren erfolgen. Größere Erfahrungen liegen nur mit den zwei erstgenannten vor. Nach Eppley (1974) verfügen die biologischen Verfahren über eine zwar hohe Empfindlichkeit, haben aber nur geringe Spezifität, während die physikalisch-chemischen Methoden dagegen sehr spezifisch aber weniger empfindlich sind.

2.6.1 Physikalisch-chemische Verfahren

Die Dünnschichtchromatographie (DC) auf Silicagel-Platten ist die verbreitetste Methode zum Nachweis von Trichothecenen. Das Verfahren beruht auf der Trennung von vorgereinigten Extrakten auf mit Kieselgel beschichteten Glasplatten durch spezielle Fließmittel. Als Referenz dienen die Standardtoxine und deren unterschiedliche Laufhöhe (BAUER, 1980). DAS zeigt allerdings keine Absorption im UV- und sichtbaren Bereich des Spektrums und kann deshalb erst nach vorheriger Derivatisierung detektiert werden. Für den dünnschichtchromatographischen Nachweis werden daher DC-Platten zur Derivatisierung mit Schwefelsäure behandelt (UENO et al., 1973).

Als weitere physikalisch-chemische Verfahren zum Nachweis von DAS seien noch die Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Gas-Flüssigkeitschromatographie erwähnt.

2.6.2 Biologische Nachweisverfahren

Zum biologischen Nachweis von Trichothecenen werden lebende Organismen oder Zellkulturen verwendet.

DAS besitzt antibiotische, antiprotozoische, insektizide phytotoxische und zytotoxische Eigenschaften, die für einen Nachweis Verwendung finden könnten (UENO, 1980).

Einen Überblick über die biologischen Nachweisverfahren zeigt die Tab.7.

2.6.3 Immunologische Verfahren

Zum Nachweis von Trichothecenen wurden in den letzten Jahren sehr spezifische und empfindliche immunologische Methoden erarbeitet, wofür die Entwicklung von spezifischen poly- und monoklonalen Antikörpern Voraussetzung war. Der Radioimmunosorbent-Assay (RIA) und der direkte, kompetitive Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay (ELISA) erlauben einen Toxinnachweis von 0,1 - 0,5 ng bzw. 2,5 - 25 pg/Assay. RIA und ELISA sind somit zur Zeit die empfindlichsten Nachweisverfahren für diese Substanzen. Sie beruhen auf der Konkurrenz eines radioaktiv- bzw. enzymmarkierten Toxins mit einem gesuchten unmarkierten Toxin um die spezifischen Bindungsstellen der Antikörper im Untersuchungssystem. Vor kurzem ist auch für DAS ein ELISA entwickelt und beschrieben worden (KLAFFER et al., 1988).

Tabelle 7: Biologische Nachweisverfahren für DAS
(in Anlehnung an GAREIS, 1982)

Testsystem	Nachweis- grenze (ug/ml)	spezifische Wirkung	Literatur
Pflanzen			
Erbsen (Pisum sativum)	1,00	Wachstums- hemmung bei Sämlingen	BRIAN et al. (1961)
Bohnen (Phaseolus vulgaris)	0,25	Wachstums- hemmung der Blätter	BRIAN et al. (1961)
Pollen (Nicotina sivestris)	0,02	Keimhemmung der Pollen	SIRIWARDANA et al. (1978)
Arthropoden			
Artemia salina	0,08	LD ₅₀ für Larven	EPPLEY (1974)
Vertebraten			
Hühnerembryo	0,5 ⁺	Absterben	GEDEK (1972)
Maus	40,0	Trinkwasser- verweigerung	BURMEISTER et al. (1980)
Meerschweinchen	0,2 ⁺⁺	Hauttoxizitäts- test	UENO et al. (1970)
Zellkulturen			
MDCK ⁺⁺⁺	0,01	Cytotoxizität	WERMTER (1980)
Kaninchen- retikulozyten	0,05	Hemmung der Protein- biosynthese	UENO et al. (1969)

⁺ pro Ei
⁺⁺ pro Hauttupfen
⁺⁺⁺ Zelllinie, gewonnen aus Hundenieren

2.7 Immunisierung gegen DAS

Bisher erfolgte die Antikörpergewinnung gegen niedermolekulare Toxine in erster Linie zu analytischen Zwecken, speziell um in unter 2.6.2 erwähnten serologischen Nachweismethoden eingesetzt zu werden. Eine Immunisierung, um eine Schutzwirkung gegen Trichothecene zu erzielen, wurde erst in jüngster Zeit angestrebt.

Die Immunisierung ist kompliziert und zeitaufwendig, da die Trichothecene auf Grund ihres geringen Molekulargewichtes (248-562) nicht immunogen wirksam sind. Sie müssen daher vor der Immunisierung durch Konjugation an ein Polypeptid- oder Protein-trägermolekül immunogen wirksam gemacht werden.

Für die Kopplungsreaktion ist es erforderlich, in einem ersten Schritt reaktive Gruppen in das Toxinmolekül einzubauen. Hierzu werden mit Hilfe bifunktioneller Säureanhydride freie Hydroxylgruppen in reaktive Hemisuccinate oder Hemiglutarate überführt. Die reaktiven Gruppen können dann mittels der Carbodiimid- oder der gemischten Anhydridmethodik an ein Trägerprotein konjugiert werden (CHU, 1986).

2.8 Aktive Immunisierung; Passive Immunisierung

FEUERSTEIN et al. (1985) berichteten über die Schutzwirkung eines monoklonalen Antikörpers gegen das Trichothecen T 2 Toxin. Dieser Antikörper war in der Lage, im in-vitro-Versuch die Proteinsynthesehemmung durch T 2 Toxin zu verhindern und bei Ratten in vivo eine Schutzwirkung gegen eine intraarterielle T 2 Gabe LD₉₉ (1 mg/kg KGW) zu bewirken. Bei Verabreichung des Antikörpers 30 min vor der Toxinexposition, konnte so eine 100 %ige Schutzwirkung erzielt werden.

BÖHM (1987) konnte in seinen Untersuchungen bei einer aktiven Immunisierung gegen T 2 Toxin bei Meerschweinchen einen deutlichen Immunschutz erzielen.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Ermittlung von LD Werten bei oraler Toxinapplikation

3.1.1 Material

- Versuchstiere:

Alle Versuche wurden mit weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt.

Die Versuchstiere stammten aus den med. Versuchstierzuchten GmbH, Savo Ivanovas, Kisslegg/Allgäu.

Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen zu je zehn Tieren gehalten. Sie erhielten pelletiertes Fertigfutter (Altromin) und Trinkwasser ad libitum.

Das Fertigfutter wurde im Rahmen eines anderen, am Institut durchgeführten, Versuchsvorhabens auf die Freiheit von DAS untersucht.

- Gebogene Knopfkanülen (Firma Hauptner)

- Diacetoxyseirpenol (DAS) (Sigma, D 0761)

- N,N-Dimethylformamid (DMF) (Sigma, D 4254)

3.1.2 Methodik

Eine Verabreichung von DAS über das Trinkwasser wurde nicht in Betracht gezogen, da nach einer Untersuchung von BURMEISTER et al: (1980), in Trinkwasser gelöstes DAS von Mäusen schon in sehr geringen Dosen verweigert wird.

Für alle oralen Belastungen wurde DAS mit der Analysenwaage abgewogen, in Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit sterilisiertem aqua dest. zur Stammlösung verdünnt. Der Anteil des Lösungsvermittlers DMF betrug 5 Vol% der Stammlösung (KRIEGLEDER, 1980).

Bei der Ermittlung der LD₅₀ und bei allen späteren Belastungsversuchen wurde den Tieren zwölf Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Die Eingabe des gelösten DAS erfolgte mit einer gebogenen Knopfkanüle.

Da für die Toxizität bei oraler Verabreichung an Mäuse noch keine Literaturangaben vorlagen, wurden vor Ermittlung der LD Werte zur Eingrenzung der Applikationsdosen Vorversuche mit je zwei Tieren durchgeführt. Daraus wurden die für den Hauptversuch verwendeten Toxinkonzentrationen abgeleitet.

Für den Hauptversuch wurden die Tiere am Vortag einzeln gewogen und markiert. Das Durchschnittsgewicht der Tiere lag bei 39,5 g $\pm$ 15 % . Es wurden vier Gruppen zu zehn Tieren gebildet, die mit je 5, 6, 7.2, 8.64 mg/kg KGW belastet wurden. Da jedes Tier die gleiche Flüssigkeitsmenge (1000 μ l) erhalten sollte, wurde, um die Gewichtsunterschiede auszugleichen, eine Toxinstandardlösung hergestellt. Diese enthielt 500 μ g DAS/ml und wurde dann mit sterilem aqua dest. so eingestellt, daß die Individualdosis für jedes Tier in 1000 μ l enthalten war.

Eine Kontrollgruppe von zehn Tieren erhielt nur das Lösungsmittel (50 μ l DMF + 950 μ l aqua dest.).

Die Tiere wurden nach der Toxinapplikation zunächst stündlich, später alle zwei (nachts alle vier) Stunden beobachtet.

3.1.3 Ergebnisse

3.1.3.1 Klinische Befunde

Nachdem in den ersten beiden Stunden Futter- und Wasseraufnahme normal waren, zeigte sich bei den ersten Tieren nach zwei Stunden stark reduziertes Allgemeinbefinden und ein gesträubtes Haarkleid. Nach einer längeren Phase in der keine weitere Verschlechterung eintrat, zeigte ein Teil der Tiere auch Lähmungserscheinungen in Form von Nachhandparesen.

Das erste Tier starb 19 h (Gruppe 5 mg/kg KGW) ein weiteres Tier 24 h (Gruppe 7,2 mg/kg KGW) nach der Toxinapplikation. Alle anderen durch das Toxin geschädigten Tiere starben innerhalb von 36 h. Die Überlebenden Tiere wurden ohne weitere äußere Anzeichen einer Intoxikation am neunten Tag nach Versuchsbeginn getötet.

3.1.3.2 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei einem späteren Belastungsversuch wurden zwei moribunde Kontrolltiere, die mit einer LD_{50} belastet worden waren, euthansiert und pathologisch anatomisch makroskopisch sowie histologisch untersucht. Die Tiere zeigten die von KRIEGLEDER (1980) bei Meer-schweinchen beschriebenen Befunde. Im Einzelnen wurde folgendes diagnostisiert:

Makroskopisch stand eine hochgradige Hyperämie der Magendarm-schleimhaut im Vordergrund. Die mikroskopischen Befunde zeigten: akut disseminierter Einzelzelluntergang in der Leber in einer Lokalisation mit zellig-resorptiver Reaktion; dezente Lympho-klasie in der Milz; Eiweißzylinder in den Harnkanälchen der Niere in Mark und Papille.

3.1.3.3 LD Werte bei oraler Toxinapplikation

Die zur Ermittlung der LD_{50} nötigen Daten wurden protokolliert und mittels der Probitanalyse (in CAVALLI-SFORZA, 1980) ausgewertet.

Demnach beträgt die LD_{50} weiblicher NMRI-Mäuse bei oraler Verab-reichung von DAS 8,32 mg/kg KGW. Die weiteren LD Werte sind in Tab.8 festgehalten.

3.2 Ermittlung von LD Werten bei intravenöser Toxinapplikation

3.2.1 Material

- Sterile Einmalkanülen 0,45 x 23
- Sterile physiologische Kochsalzlösung (Fresenius)
- Versuchstiere siehe 3.1.1
- Diacetoxyscirpenol (DAS) (Sigma, D 0761)
- Ethanol p.a. Merck, Darmstadt

3.2.2 Methodik

Für alle intravenösen Belastungen wurde das Toxin in Ethanol (1:40) gelöst und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf das jeweilige Gesamtvolumen aufgefüllt.

Vor der intravenösen Toxinapplikation wurden die Schwanzvenen der Mäuse mit heißem Wasser hyperämisiert .

Die Toxinlösung wurde so eingestellt, daß die Dosis individualisiert in 500 µl enthalten war. Diese Menge wurde über die Schwanzvene intravenös appliziert. In einem Vorversuch wurden je zwei Tiere mit 1, 2, 4, 6, 8, und 10 mg/kg KGW belastet. Die Beobachtung der Tiere erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben. Im Hauptversuch wurden zunächst sechs Tiere pro Gruppe mit je 2, 4, 6, 8 mg/kg KGW belastet. Eine Kontrollgruppe von sechs Tieren erhielt nur das Lösungsmittel Ethanol in steriler physiologischer Kochsalzlösung (1:40). Zur besseren Abgrenzung des Dosisbereichs wurden später nochmals zehn Tiere pro Gruppe mit je 1, 2, 4, 8 mg/kg KGW belastet.

3.2.3 Ergebnisse

3.2.3.1 Vorversuch

Die klinischen Symptome glichen den unter 3.1.3.1 beobachteten und beschriebenen. Die mit 1 bzw. 2 mg/kg KGW belasteten Tiere überlebten die Belastung ohne Anzeichen klinischer Symptome. Von den beiden mit 4 bzw. 6 mg belasteten Tieren überlebte je ein Tier die Belastung. Alle Tiere, die mit 8 bzw. 10 mg/kg KGW belastet wurden, starben 12 - 16 Stunden nach der Exposition.

3.2.3.2 Hauptversuch

Die Auswertung des Versuchs wurde wie unter 3.1.3.3 beschrieben durchgeführt und ergab eine LD50 bei 7,02 mg/kg KGW. Weitere LD-Werte für eine intravenöse Toxinapplikation sind in Tab.9 festgehalten.

Tabelle 8: LD Werte bei oraler Toxinapplikation

LD ₁₀ :	6,03	LD ₆₀ :	8,78
LD ₂₀ :	6,82	LD ₇₀ :	9,26
LD ₃₀ :	7,39	LD ₈₀ :	9,83
LD ₄₀ :	7,87	LD ₉₀ :	10,62
LD ₅₀ :	8,32	LD ₉₉ :	12,48

Alle Angaben in mg/kg KGW

Tabelle 9: LD Werte bei intravenöser Toxinapplikation

LD ₁₀ :	2,77	LD ₆₀ :	7,86
LD ₂₀ :	4,23	LD ₇₀ :	8,75
LD ₃₀ :	5,28	LD ₈₀ :	9,80
LD ₄₀ :	6,18	LD ₉₀ :	11,26
LD ₅₀ :	7,02	LD ₉₉ :	14,72

Alle Angaben in mg/kg KGW

3.3 Antigene und Antigenherstellung

Im Rahmen anderer im Hause durchgeführter Untersuchungen standen bereits DAS-Hemisuccinat-Humanserumalbumin (DAS-HS-HSA) und DAS-Hemiglutarat-Humanserumalbumin (DAS-HG-HSA) als Antigene zur Verfügung. Im Vorversuch zeigte sich, daß DAS-HS-HSA in Mäusen keine Antikörperproduktion induzieren konnte. Dieses Konjugat fand daher keine weitere Anwendung. Es mußte ein neues DAS-Proteinkonjugat als Antigen angewendet werden, dessen Herstellung im folgenden beschrieben wird.

3.3.1 Material

Reagenzien und Lösungen:

- Diacetoxyscirpenol (DAS) (Sigma, D 0761)
- Humanes Serumalbumin (HSA) (Sigma, A 3782)
- Glutarsäureanhydrid (Sigma, G 8136)
- 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)-carbodiimid (EDPC) (Sigma, E 6383)
- Pyridin (Sigma, P 3776)

- Phosphatpuffer (PBS) pH 7,2 in der Zusammensetzung:
 - 0,116 mol/l NaCl
 - 0,010 mol/l Na_2HPO_4
 - 0,003 mol/l KH_2PO_4

Verwendete Reagenzien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und hatten p.a.- Qualität.

Gerätschaften:

- Silica-Gel-Dünnschichtchromatographie-Platten ohne Fluoreszenz-indikator (Sigma, T 6895)
- Magnetrührer MR 2002 (Heidolph)

- Gefriertrocknungsgerät, Leybold-Heraeus GT-2
- UV-Lampe: MIN UVIS, (Desaga)
- Rotationsverdampfer, (Büchi)
- UV-Monitor UA 5 (ISCO)
- Variopipetten: 0,5 - 10 μ l; 10 - 100 μ l; 100 -1000 μ l (Eppendorf)

3.3.2 Methodik

3.3.2.1 Herstellung eines zur Kopplung an einen Proteinträger befähigten Toxinderivates

In Anlehnung an die Methode von CHU et al. (1984) wurde Glutar-säureanhydrid in das DAS-Molekül eingeführt:

50 mg DAS wurden in 1 ml Pyridin gelöst und mit 600 mg Glutar-säureanhydrid 6 h im Dampftopf erhitzt. Zur Überprüfung der Umsetzung wurde nach 3 und 5 h eine Probe entnommen und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in 15 ml Chloroform aufgenommen, in einen Scheidetrichter überführt und dreimal jeweils 15 min mit 35 ml aqua dest. gewaschen. Die Einengung der Chloroformphase bis zur Trockne fand im Rotationsverdampfer bei 37⁰ C statt. Der Rückstand wurde in 10 ml MeOH gelöst.

3.3.2.2 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Umsetzung

Die Verlaufskontrolle der Umsetzung erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Hierzu wurden Silica-Gel-Dünnschichtplatten (ohne Fluoreszenzindikator) bei 110⁰ C 15 min im Sterilisator aktiviert. 1 μ l einer Standardlösung (1 mg/ml in MeOH) und 1 μ l der Probe wurden auf die vorbehandelte Platte aufgetragen und in einer Toluol/Ethylacetat-Lösung (1:3) chromatographiert. Die Platte wurde luftgetrocknet, zur Derivatisierung mit 30% H₂SO₄ besprüht und bei 130⁰ C 10 min erhitzt.

3.3.2.3 Kopplung des Toxinderivates an einen Proteinträger (Humanserumalbumin)

Die Kopplung fand mit der von CHU et al. (1979) beschriebenen Carbodiimidmethode statt: Es wurden 50 mg des in 10 ml MeOH gelösten DAS-HG (siehe 3.3.2.1) tropfenweise mit 1400 mg EDPC in 20 ml aqua dest. vermischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 60 mg HSA in 20 ml aqua dest. gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 3 Tage gegen 2 x 5 l PBS dialysiert, anschließend portioniert und gefriergetrocknet. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach LOWRY et al. (1951).

3.3.3 Ergebnisse

Bei der dünnstschichtchromatographischen Überprüfung ergab sich für die nach fünfstündiger Reaktionszeit entnommene Probe eine vollständige Umsetzung zu DAS-HG (r_F -Wert: 0,70). Die Probe unterschied sich somit deutlich vom DAS-Standard, der einen r_F -Wert von 0,66 besaß. Die Proteinbestimmung ergab für DAS-HG-HSA einen Proteingehalt von 1080 µg/ml.

3.4 Vorversuch zur aktiven Immunisierung gegen DAS

3.4.1 Material

- Versuchstiere siehe 3.1.1

Reagenzien und Lösungen:

- DAS-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase
- Fetales Kälberserum (FCS) (Sigma, F 4315)
- Steriles pyrogenfreies Aqua ad injectabilia (Fresenius)

- Komplettes Freund'sches Adjuvans (Sigma, F 5881)
- Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Sigma F 5506)
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) (Sigma, P 1379)
- 3,3',5',5'-Tetramethylenbenzidin (TMB) (Sigma, T 2885)

Geräte:

- Taumelgerät Reax 3 (Heidolph)
- 12-Kanalpipette (Flow Laboratories)
- Microelisplatten "Immuno Plate I 96 F" (Nunc)
- Elisa-Autoreader Typ MR 580 (Firma Dynatech)

Die in dieser Arbeit wiederholt eingesetzten Puffer sowie die Waschlösung hatten folgende Zusammensetzung:

- Phosphatpuffer (PBS) pH 7,2 (Zusammensetzung siehe 3.3.1)
- Carbonat-Bicarbonatpuffer pH 9,6
 - Na_2CO_3 mol/l
 - NaHCO_3 mol/l
- Peroxidase-Puffer pH 3,95
 - 0,21 mol/l Citronensäuremonohydrat
 - + 200 ml 1 mol/l KOH
 - + 3,15 mmol/l H_2O_2
 - ad 1000 ml aqua dest.
- Herstellung der TMB-Lösung:
 - 252 mg TMB in 5 ml Aceton und 45 ml MeOH lösen

- Substratlösung:

1 mmol/l TMB in Peroxidasepuffer

- Waschlösung:

NaCl 0,14 mol/l

0,025 % Tween 20

3.4.2 Methodik

Im Vorversuch wurden die beiden zu Verfügung stehenden Antigene DAS-HS-HSA und DAS-HG-HSA verwendet.

Zur Ermittlung der effektiveren Applikationsweise wurden mit jedem Antigen je eine Gruppe von zehn Tieren intraperitoneal (i.p.) bzw. subcutan (s.c.) immunisiert.

Hierdurch ergab sich folgende Einteilung:

Gruppe A: Tier A1-A10 DAS-HS-HSA i.p.

Gruppe B: Tier B1-B10 DAS-HS-HSA s.c.

Gruppe C: Tier C1-C10 DAS-HG-HSA i.p.

Gruppe D: Tier D1-D10 DAS-HG-HSA s.c.

Die Impfdosis betrug in allen Versuchen 50 µg DAS-HS-HSA bzw. DAS-HG-HSA pro Tier (Proteinbestimmung nach LOWRY).

Die lyophilisierten Impfkongugate wurden vor der Immunisierung so in aqua ad injectabilia gelöst, daß in 50 µl 50 µg Proteinanteil enthalten waren. Die Impfkongugate wurden für die Grundimmunisierung in komplettem, für die Restimmunierungen in inkomplettem Freund'schen Adjuvans im Verhältnis 1:3 emulgiert.

Restimmunierungen erfolgten am 21., 49. und 65. Tag nach der Grundimmunisierung.

Die Blutentnahmen zur Antikörpertiterbestimmung erfolgten unmittelbar vor (Tag 0), am 14., 35., 63. und 79. Tag nach der

Grundimmunisierung aus dem orbitalen Venenplexus in Äthernarkose. Zur Gewinnung des Präimmunserums (Tag 0) wurde das Blut aller Tiere gepoolt.

Ab der ersten Blutentnahme nach der Grundimmunisierung wurden die Tiere an den Ohren markiert und alle weiteren Blutproben individuell behandelt.

Für die Serumgewinnung wurden die Blutproben drei Stunden bei 37° C inkubiert, eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt, dann in der Kühlzentrifuge bei 4° C 20 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert.

3.4.2.1 Nachweis der Antikörper mittels Doppel - Antikörper - Technik im ELISA

Hierzu wurden Microtiterplatten mit Kaninchen anti-Maus IgG in Carbonat-Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität; 10 µg/ml) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 3 % FCS/PBS zur Vermeidung unspezifischer Bindungen abgesättigt (150 µl pro Kavität; 30 min). Nach dem Ausschlagen und Waschen der Platten wurden die Seren der Mäuse zupipettiert. Die Ausgangsverdünnung der Seren in PBS betrug 1:90 und wurde in der Platte in Dreierschritten weiterverdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur, erneutem Ausschlagen und Waschen der Platten, wurde DAS-HS-Meerrettichperoxidase Konjugat (DAS-HS-HRP) in einer Verdünnung von 1:16.000 (in 2% FCS/PBS) zugegeben (100 µl pro Kavität) und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Ausschlagen und Waschen der Platten wurde die Substratlösung zugesetzt. Die enzymatische Substratumsetzung wurde nach ca. 10 min mit 1 M H₂SO₄ (100 µl pro Kavität) abgestoppt und die resultierenden Extinktionen direkt im ELISA-Autoreader bei 450 nm ausgewertet.

Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung festgelegt, bei der noch eine Extinktion von 0,3 Einheiten vorlag. Um auszuschließen, daß bereits vor der Immunisierung ein spezifischer Antikörperspiegel bestand oder Peroxidasekonjugat unspezifisch gebunden wurde, wurde Serum, das vor der Grundimmunisierung gewonnen wurde (Präimmunserum), als Nullwert mituntersucht.

3.4.3 Ergebnisse der Antikörpertiterbestimmung

In den Gruppen A und B, in denen die Tiere mit DAS-HS-HSA i.p. bzw. s.c. immunisiert wurden, konnten zu keinem Zeitpunkt Antikörper nachgewiesen werden. In der Gruppe D, in der mit DAS-HG-HSA subcutan immunisiert wurde, wies nur ein Tier einen Antikörpertiter auf. (D5 ; Antikörpertiter 1: 21.870)

Beste Immunantworten wurden in der Gruppe C erzielt. In dieser Gruppe wurden die Tiere mit DAS-HG-HSA i.p. immunisiert.

Das Ergebnis der Antikörpertiterbestimmungen des Vorversuchs ist in der Tab.10 festgehalten.

Die Abb.2 veranschaulicht die Höhe der Antikörpertiter der einzelnen Tiere in Gruppe C nach den Restimulierungen.

Tabelle 10: DAS-Antikörpertiter bei den mit DAS-HG-HSA i.p.
immunisierten Mäusen C1 mit C10

Tage nach der Grundimmunisierung			
ELISA-Titer			
Tier	35.	63.	79.
C1	-	1: 196.830	1: 65.610
C2	-	-	-
C3	-	+	
C4	-	-	-
C5	-	1: 21.870	+
C6	-	1: 65.610	1:196.830
C7	-	1: 65.610	1.196.830
C8	1: 21.870	1 : 65.610	1:196.830
C9	-	1: 21.870	+
C10	-	1: 65.610	1:196.830

+ Tier im Versuchsverlauf gestorben

Titerbestimmung im Vorversuch

Immunisierung mit DAS - HG - HSA i.p.



3.5 Hauptversuch zur aktiven Immunisierung gegen DAS

3.5.1 Material siehe 3.4.1

3.5.2 Methodik

Da im Vorversuch DAS-HS-HSA keine Antikörperbildung in Mäusen induzieren konnte, wurde im Hauptversuch nur mit DAS-HG-HSA immunisiert. Auch auf einen weiteren Versuch, durch eine subcutane Applikation eine Antikörperproduktion anzuregen, wurde verzichtet.

Der Immunisierungsplan des Vorversuchs wurde im wesentlichen beibehalten. Die Dosierung betrug wie im Vorversuch 50 µg Toxin-konjugat pro Tier. Da für aussagekräftige Belastungsversuche möglichst viele aktiv immunisierte Tiere zu Verfügung stehen sollten, wurden 55 Mäuse i.p. mit DAS-HG-HSA neu immunisiert.

Restimulierungen wurden am 28., 61. und 77. Tag nach der Grundimmunisierung durchgeführt.

Die Blutentnahmen zur Antikörpertiterbestimmung aus dem orbitalen Venenplexus erfolgten am 41., 61., und am 77. Tag nach der Grundimmunisierung. Wie im Vorversuch wurden die Tiere bei der ersten Blutentnahme am Ohr gekennzeichnet. Die Tiere wurden folgendermaßen bezeichnet:

A1-A10; B1-B10; C1-C10, D1-D10, E1-E10; F1-F5.

Bei Tieren, die auf Grund ihrer guten Antikörperbildung dem Belastungsversuch unterzogen wurden, erfolgte eine zusätzliche Blutentnahme zwei Tage vor der Exposition.

Da im Vorversuch nach der Grundimmunisierung keine Antikörperbildung erfolgte, wurde auf eine Titerbestimmung 14 Tage nach der Grundimmunisierung verzichtet.

Die Ermittlung der Antikörpertiter erfolgte wie unter 3.3.2.1 beschrieben.

3.5.3 Ergebnisse

Die Antikörperbildung erfolgte bei den einzelnen Tieren sehr unterschiedlich. Bei 19 Tieren (34,5 %) ließen sich zu keinem Zeitpunkt Antikörper nachweisen. Acht Tiere (14,5 %) wiesen nach der dritten Restimulierung Antikörpertiter von 1:21.870, elf Tiere (20,0 %) von 1:65.610 und sieben Tiere (12,7 %) von 1:196.830 auf. Bei acht Tieren (14,5 %) konnten im Versuchsverlauf zwar Antikörpertiter in unterschiedlicher Höhe nachgewiesen werden, die jedoch nach der zweiten bzw. dritten Restimulierung nicht mehr vorhanden waren. Zwei Tiere (3,6 %) starben im Versuchsverlauf. In Tab.11 ist das Ergebnis der Antikörpertiterbestimmungen des Hauptversuches festgehalten. Die Abb.3 veranschaulicht die prozentuale Verteilung der Immunantworten nach der letzten Titerbestimmung.

Tabelle 11: DAS-Antikörpertiter bei den mit DAS-HG-HSA i.p. immunisierten Mäusen: A1 - A10; B1 - B10; C1 - C10; D1 - D10; E1 - E10; F1 - F5.

ELISA-Titer			
Tage nach der Grundimmunisierung			
Tier	41.	61.	77.
A1	1: 65.610	1: 65.610	+
A2	-	-	-
A3	-	-	1: 21.870
A4	-	-	-
A5	-	1: 21.870	1:196.830
A6	-	1: 65.610	1:196.830
A7	1: 65.610	1: 65.610	1:196.830
A8	1: 21.870	1: 7.290	1: 65.610
A9	1: 7.290	-	-
A10	1: 270	-	-
B1	1: 21.870	1: 7.290	1: 21.870
B2	-	-	1: 65.610
B3	1: 65.610	-	-
B4	1: 21.870	+	-
B5	-	-	-
B6	1:196.870	1: 65.610	1:196.830
B7	-	-	-
B8	-	-	-
B9	1: 7.290	1: 7.290	1: 21.870
B10	1: 21.870	-	-

Fortsetzung Tabelle 11:

C1	1:	90	-	-
C2	1:	7.290	1: 65.610	1:196.830
C3	1:	21.870	1: 7.290	1: 21.870
C4	1:	210	-	-
C5	-	-	-	-
C6	-	-	-	-
C7	-	-	1: 21.870	1: 65.610
C8	-	-	1: 7.290	1: 65.610
C9	-	-	1: 65.610	1:196.830
C10	-	-	-	-

D1	-	-	1: 65.610	-
D2	-	-	-	-
D3	-	-	1: 65.610	1: 65.610
D4	-	-	-	-
D5	-	-	-	-
D6	-	-	-	-
D7	-	-	-	1: 65.610
D8	-	-	-	-
D9	-	-	-	-
D10	-	-	-	-

E1	-	-	1: 21.870	-
E2	-	-	-	-
E3	-	-	1: 21.870	1: 21.870
E4	-	-	1: 21.870	1: 65.610
E5	-	-	1: 21.870	1: 21.870
E6	-	-	1: 21.870	1: 21.870
E7	-	-	1: 21.870	1: 21.870
E8	-	-	-	-
E9	1:	21.870	1: 65.670	1:196.830
E10	-	-	1: 21.870	1: 65.610

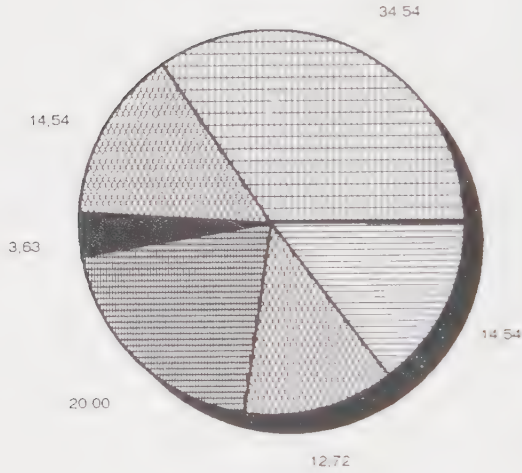
Fortsetzung Tabelle 11:

F1	-	-	1: 65.610
F2	-	1: 65.610	1: 65.610
F3	-	-	-
F4	1: 21.870	1: 65.610	1: 65.610
F5	-	-	-

+ Tier im Versuchverlauf gestorben

Antikörpertiterhöhe

Verteilung in %



Reihenfolge im Uhrzeigersinn:

- 34,54% : 19 Tiere ohne Antikörpertiter
- 14,54% : 8 Tiere Antikörpertiter 1: 21.870
- 12,72% : 7 Tiere Antikörpertiter 1: 196.830
- 20,00% : 11 Tiere Antikörpertiter 1: 65.610
- 3,63% : 2 Tiere im Versuchsverlauf gestorben
- 14,54% : 8 Tiere Antikörpertiter abgefallen

Abbildung 3: Prozentuale Verteilung der Antikörpertiterhöhe

3.5.4 Empfindlichkeit der Antiseren gegen DAS

Durch diesen Versuch sollte geklärt werden, wie hoch die Affinität der Antikörper zu freiem DAS ist, so daß enzymmarkiertes Toxin an der Bindung gehindert wird. Hierzu wurden Microtiterplatten mit anti-Maus IgG (10 µg/ml in Bicarbonatpuffer; 100 µl pro Kavität) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 3 % FCS/PBS für 30 min abgesättigt (150 µl pro Kavität).

Die Seren der belasteten Versuchstiere wurden 1:20.000 in PBS verdünnt und aufpipettiert. Nach einer Stunde auf dem Taumler wurden die Platten dreimal gewaschen und ausgeschlagen.

Aus einem Toxinstandard, der 1 mg/ml DAS (in MeOH) enthielt, wurde in 10er Verdünnungsschritten mit 10 % MeOH/PBS eine Toxinstandardreihe hergestellt, deren niedrigste und höchste Toxinkonzentration 1 pg bzw. 100 µg/ml betrugen.

Zusammen mit einem Leerwert wurden je 50 µl dieser Standardreihe und 50 µl DAS-HS-HRP (1:5.000 in 2 % FCS/PBS) simultan eine Stunde mit der Festkörperphase inkubiert. Substratzugabe und Messung erfolgte wie unter (3.4.2.1) beschrieben.

Aus den vier Meßwerten pro Toxinstandard wurde der jeweilige Mittelwert errechnet. Die Hemmungskurve wurde anschließend auf Millimeterpapier graphisch dargestellt, wobei die Absorption des Leerwertes mit 100 % gleichgesetzt wurde.

3.5.5 Ergebnisse

Es zeigte sich, daß die Affinität der Antiseren gegen das Toxin sehr unterschiedlich war. Abb.4 zeigt am Beispiel der Seren der Tiere B6 und C9 den Verlauf der Hemmkurven. Für das DAS-Antiserum der Maus B6 ergibt sich hieraus eine 50 % ige Absättigung der Antikörper erst bei einer Toxinkonzentration von 10 µg/ml, dagegen waren die Antikörper der Maus C9 schon bei einer Toxinkonzentration von nur 10 ng/ml zu 50 % abgesättigt.

Empfindlichkeit der Antiseren

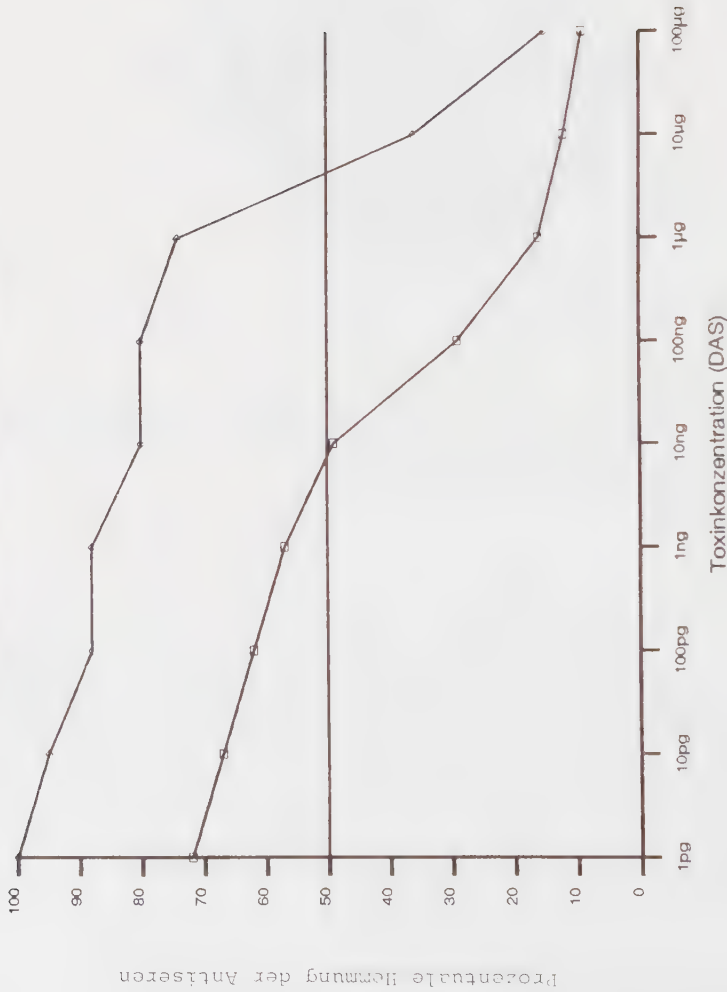


Abbildung 4: Empfindlichkeitsbestimmung der Antiseren

3.5.6 Bestimmung sekretorischer Antikörper aus Darmspülproben (Nachweis von IgA-Antikörpern)

Zwei Tiere aus dem Hauptversuch (C7;A7; Antikörpertiter 1:65.610) wurden in Äthernarkose entblutet, euthanasiert, der Dünndarm zur Gewinnung von Darmspülproben exenteriert und das Darmvolumen mit je 3 ml gepufferter Salzlösung nach Hanks (HBBS) gespült. Dem Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch 100 $\mu\text{mol/l}$ Phenylmethan-sulfonylfluorid (PMSF) als Proteinaseinhibitor zugesetzt (JAMES, 1978).

Der Nachweis von IGA-Antikörpern erfolgte mittels Doppel-Antikörpertechnik im ELISA. Hierzu wurden Microtiterplatten mit Kaninchen-anti-Maus IgA (100 μl pro Kavität; 10 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 3% FCS/PBS (150 μl pro Kavität; 30 min) abgesättigt. Die Platten wurden mit Waschlösung gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde ein Maus IgA-Standard (10 $\mu\text{g/ml}$), eine Serumverdünnung (1:100 in PBS), sowie eine Darmspülprobe (1:3 in PBS) zupipettiert und in der Platte 1:3 weiterverdünnt. Für die Darmspülprobe wurde PBS mit 100 $\mu\text{mol/l}$ (PMSF) versetzt. Nach einer Stunde auf dem Taumler wurde die Platte gewaschen, ausgeschlagen und Kaninchen anti-Maus IgA-HRP für eine weitere Stunde aufgetragen (1:1000 in 1 % FCS/PBS; 100 μl pro Kavität).

Nach erneutem Ausschlagen und Waschen der Platten wurde Substratlösung (100 μl pro Kavität) zugegeben. Die Enzymreaktionen wurden nach ca. 10 min mit 1 mol/l H_2SO_4 abgestoppt und die Substratveränderungen direkt im ELISA-Autoreader bei 450 nm ausgewertet. Die Ermittlung des Gehaltes der Proben an IgA-Antikörpern erfolgte durch Vergleich mit dem IgA-Standard.

Zur Feststellung, inwieweit die IgA-Antikörper gegen das Toxin gerichtet waren, wurde der oben beschriebene Versuch anstelle des Kaninchen anti-Maus IgA-HRP mit DAS-HS-HRP durchgeführt.

3.5.7 Ergebnisse

Durch Vergleich der Proben mit dem IgA-Standard konnten in den Darmspülproben beider Tiere IgA-Antikörper nachgewiesen werden (39 µg/ml). Bei der Verwendung von DAS-HS-HRP zeigte sich aber, daß die IgA-Antikörper nicht gegen das Toxin gerichtet waren.

3.5.8 Orale Belastung aktiv immunisierter Tiere aus dem Vor- und Hauptversuch mit DAS

Um die Wirksamkeit der Immunisierung zu untersuchen, wurden die Mäuse einer oralen Toxinbelastung mit DAS unterzogen. Die immunisierten Tiere aus der Gruppe C des Vorversuchs (3.3.2) und zehn nicht immunisierte Kontrolltiere wurden mit der LD₉₀ (10,6 mg DAS/kg KGW) oral belastet.

Aus dem Hauptversuch wurden mit der LD₅₀ (8,32 mg DAS/kg KGW):
5 Tiere (A3,B9,C3,E3,E6) Antikörpertiter 1: 21.870
5 Tiere (B2,D3,E4,F2,F4) Antikörpertiter 1: 65.610
5 Tiere (A5,D3,B6,C2,C9) Antikörpertiter 1:196.880
zusammen mit zehn nicht immunisierten Kontrolltieren
durch orale Toxinapplikation belastet.

3.5.9 Ergebnisse der Belastungsversuche

Neun nicht immunisierte Kontrolltiere des Vorversuchs, die mit einer LD₉₀ belastet wurden, starben etwa zwischen 14 bis 16 Stunden nach der Toxinbelastung. Ein Tier der Kontrollgruppe überlebte.

Von den im Vorversuch immunisierten Tieren überlebte keines die Belastung mit einer LD_{90} . Wie bei den Kontrolltieren lag der Eintritt des Exitus lethalis etwa zwischen 14 bis 16 Stunden nach der Toxinapplikation.

Von den mit einer LD_{50} belasteten zehn Kontrolltieren des Hauptversuchs starben sieben Tiere 16 bis 36 Stunden nach der Toxinbelastung.

Von den 15 immunisierten Tieren des Hauptversuches starben acht Tiere. Auch bei diesen Tieren lag der Eintritt des Exitus lethalis zwischen 16 - 36 Stunden nach der Toxinapplikation.

3.6 Passive Immunisierung gegen DAS mit heterologem Antiserum (Kaninchen anti-DAS-Serum)

3.6.1 Material

- Cyanogen Bromide Activated Sepharose GMB-Gel (Pharmacia)
- 0,1 mol/l NaHCO_3 -Puffer (pH 8,0) mit 0,5 mol/l NaCl
- 1 mmol/l HCL
- 0,1 mol/l Ethanolamine
- 0,1 mol/l Acetatpuffer (pH 4,0)
- 0,1 mol/l Boratpuffer (pH 8,0)
- 0,1 mol/l Glycinpuffer (pH 2,5)
- Fraktionensammler (ISCO, Modell 328)
- Chromatographiesäule mit zwei Adaptern 1,0 x 40 cm (Pharmacia)

3.6.2 Methodik

3.6.2.1 Immunisierung von Kaninchen gegen DAS

Die Immunisierung und die Feststellung der Kreuzreaktionen des Kaninchen-anti-DAS-Serums mit anderen Trichothecen geschah im Rahmen anderer Untersuchungen im Hause. Das wie folgt beschrieben gewonnene Antiserum wurde für die affinitätschromatographische Reinigung zur Verfügung gestellt (KLAFFER, 1988):

Zur Gewinnung von Immunserum wurden Kaninchen nach der Methode von NIESCHLAG et al. (1975) mit DAS-HG-HSA immunisiert. 190 μg Toxin-Protein-Konjugat wurden mit 0,5 ml Aqua ad injectabilia und 1,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans intensiv vermischt. Diese Emulsion wurde den Tieren intrakutan beiderseits des geschorenen und desinfizierten Rückens auf etwa 20 Injektionsstellen verteilt, appliziert. Restimulierungen wurden nach 10, 16 und 21 Wochen durchgeführt.

Die Antikörperproduktion wurde mittels indirektem ELISA überprüft, und nach Erreichen eines genügend hohen Antikörpertiters wurden die Tiere in Narkose durch Herzpunktion entblutet. Die Ausfällung der Immunglobuline erfolgte nach der Methode von HEBERT et al. (1973). 1 ml Serum wurde mit 1 ml 70 %ig gesättigter Ammoniumsulfatlösung 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das weiße Präzipitat in PBS gelöst und auf das Ausgangsvolumen gebracht. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei der Inkubationsschritt nach der Ammoniumsulfat-Zugabe auf 5 min verkürzt wurde. Das so gefällte Serum wurde anschließend so lange gegen PBS dialysiert bis das Außendialysatsulfatfrei war. Das für diesen Versuchsabschnitt zu Verfügung gestellte Antiserum hatte im ELISA einen Antikörpertiter von 1: 2.430. Die Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Trichothecen sind in der Tab.12 zusammengestellt.

3.6.2.2 Reinigung eines Kaninchen anti-DAS-Serums mittels Affinitätschromatographie

3.6.2.2.1 Herstellung einer mit anti-Kaninchen IgG beschichteten Säule

2 g Cyanogen Bromid Activated Sepharose wurden in 50 ml 1 mmol/l HCl aufgequollen und anschließend mit 400 ml eisgekühlter 1 mmol/l HCl gewaschen und über eine Nutsche mittels Vakuumpumpe abgesaugt.

10 mg anti-Kaninchen IgG vom Schaf wurden in 5 ml 0,1 mol/l NaHCO_3 -Puffer gelöst und mit dem Gel 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Gel mit 50 ml 0,1 mol/l NaHCO_3 -Puffer, pH 8,0 gewaschen. Nach der Zugabe von 50 ml 0,1 mol/l Ethanolamine wurde das Gel auf dem Taumler 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand erneut abgesaugt. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit je 50 ml 0,1 mol/l Acetatpuffer, pH 4,0 und je 50 ml 0,1 mol/l Boratpuffer, pH 8,0. Das gekoppelte Gel wurde entgast und mit einem

Trichter in die Säule eingefüllt. Nach dem Absetzen des Gels wurde die Säule mit 0,1 mol/l NaHCO_3 -Puffer gefüllt und mit ca. 10 - 15 Säulenvolumina gespült. Die Regeneration der Säule erfolgte durch Waschung mit Boratpuffer und Acetatpuffer und einer Spülung mit PBS (0,01% Na-Azid Anteil) je 10 - 15 Säulenvolumina.

3.6.2.2.2 Reinigung des Kaninchen anti-DAS-Serums

Insgesamt 6 ml eines nach der Methode von HEBERT et al. (1973) gefällten Kaninchen anti-DAS-Serums wurden auf die anti-Kaninchen IgG-Sepharosesäule gegeben und das IgG anschließend mit 0,1 mol/l Glycinpuffer, pH 2,5 (12 Tropfen/min) eluiert und in Fraktionen zu 2,75 ml gesammelt. Das Elutionsprofil der affinitätschromatographischen Reinigung des Kaninchen anti-DAS-Serums ist in Abb.5 dargestellt.

3.6.2.3 Ermittlung des IgG-Gehaltes der isolierten Antikörper

Eine Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach LOWRY et al. (1951). Unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 0,78 (HURN und CHANTLER, 1980) wurde eine Messung bei 280 nm durchgeführt.

Die Messung nach Lowry ergab einen Proteingehalt von 255 $\mu\text{g/ml}$. Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten wurde ein IgG-Gehalt von 214 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt.

Tabelle 12: Kreuzreaktionen des Anti-DAS-Serums mit anderen Trichothecenen (KLAFFER (1988))

Toxin	Kreuzreaktionen bezogen auf DAS in %	Toxinkonzen- tration für eine 50% ige Hemmung $\times 10^{-9}$ Mol/l	Molekular- gewicht
DAS	100	0,2240	366
T2-Toxin	5,2	4,2900	466
Neosolaniol	2,5	8,9	382
15-MAS	1,5	14,1	324
HT2-Toxin	0,03	613	424
T2-Triol	0,03	851	282
Verrucarol	0,0071	3150	266
T2-Tetraol	0,0071	3150	298
Nivalenol	0,0035	6410	312
Deoxynivalenol	0,0033	6750	296
Scirpentriol	0,0032	7090	282

$$\text{Kreuzreaktion (\%)} = \frac{\text{ng/ml DAS für 50 \% Hemmung}}{\text{ng/ml anderes Toxin für 50 \% Hemmung}} \times 100$$

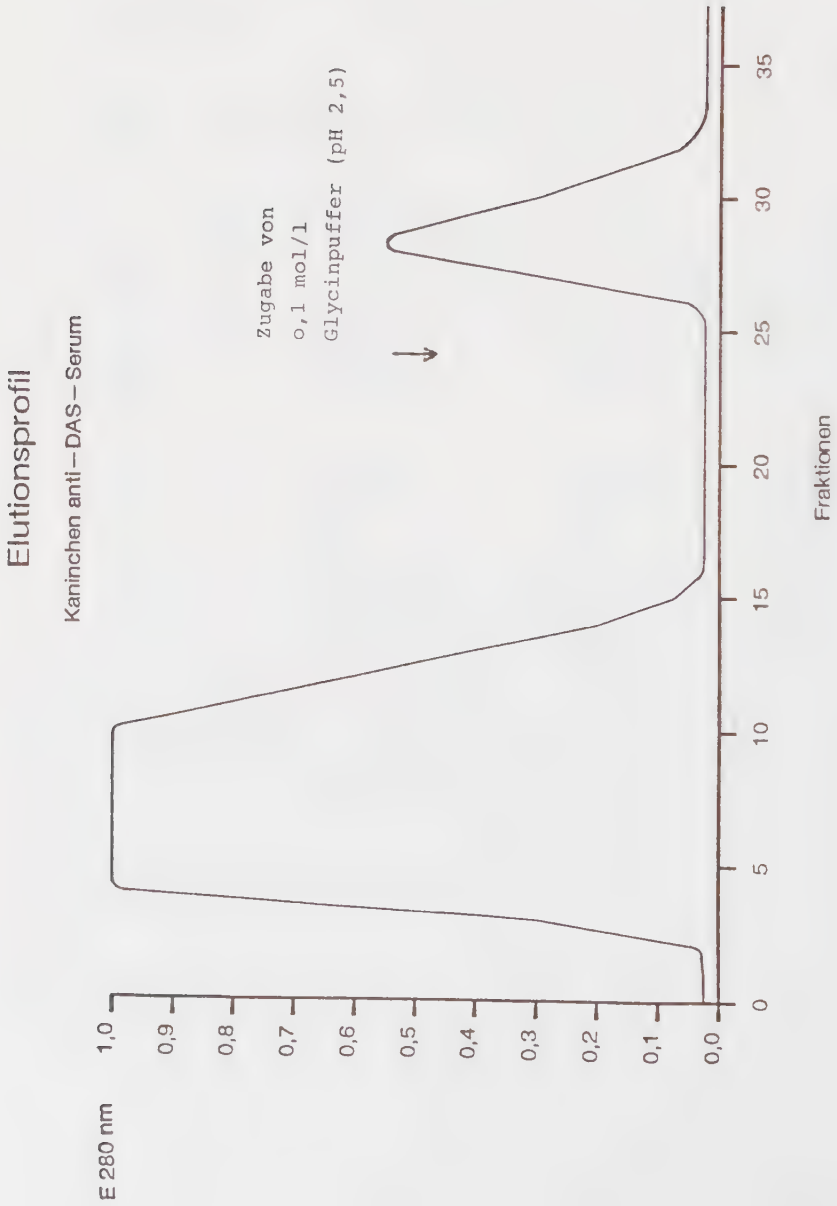


Abbildung 5: Elutionsprofil der säulenchromatographischen Reinigung des Kaninchen anti-DAS-Serums

3.6.2.4 Belastungsversuche nach passiver Immunisierung

Für die Belastungsversuche wurde sowohl für die orale als auch für die intravenöse Toxinapplikation jeweils die entsprechende LD_{90} gewählt. Unter 3.1.2 und 3.2.2 wurde die LD_{90} bei oraler Toxinapplikation mit 10,62 mg/kg KGW und mit 11,26 mg/kg KGW bei intravenöser ermittelt (Tab.8 und Tab.9).

Somit betrugen die Dosen für ein durchschnittlich schweres Versuchstier (Durchschnittsgewicht 40 g) 424 ug bei oraler bzw. 450 ug bei intravenöser Toxingabe. Das Verhältnis des Antikörpers zum Toxin entspricht 0,3 % einer äquimolaren Menge.

Um die Verträglichkeit des heterologen Kaninchen anti DAS-Antiserums zu überprüfen, wurde vor dem eigentlichen Immunisierungsversuch an vier Mäuse je 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l bzw. 500 μ l Antiserum intravenös in die Schwanzvenen appliziert. Die Tiere zeigten während 48 h bei gleichbleibendem Allgemeinbefinden keine Anzeichen einer Unverträglichkeit.

Für die passive Immunisierung wurden zehn Tieren je 500 μ l Antiserum intravenös appliziert.

Zur Feststellung, ob mit dieser Antiserumapplikation ein Immunschutz gegen DAS zu erreichen ist, wurde eine Stunde später eine orale bzw. intravenöse Toxinapplikation durchgeführt.

Sowohl für die orale als auch für die intravenöse Toxinbelastung wurde je eine Kontrollgruppe von zehn Tieren mitbelastet.

3.6.2.5 Ergebnisse

Von den oral mit der LD_{90} belasteten Tieren starben, wie bei der Ermittlung der Toxizität, sowohl die immunisierten Tiere wie auch die Kontrolltiere etwa zwischen 24 bis 36 Stunden nach der Toxingabe.

Bei den intravenös belasteten Tieren ergab sich folgendes Bild: In der Kontrollgruppe starben neun Tiere zwischen 12 bis 24 Stunden nach der Toxingabe. Von den passiv immunisierten Tieren starben zwei Tiere. Acht Tiere überlebten somit die Toxinbelastung. Diese Tiere zeigten in der Zeitspanne, in der die nicht immunisierten Kontrolltiere starben, teils ein leicht teils ein erheblich reduziertes Allgemeinbefinden.

3.7 Passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern

3.7.1 Material

- Herstellung und Spezifitätsuntersuchung des monoklonalen Antikörpers wurden von HACK im Rahmen eines Forschungsvorhabens am Institut vorgenommen. Der Antikörper wurde als Ascites zur Verfügung gestellt.
- Versuchstiere, DAS siehe 3.2.1
- Gefriertrocknungsgerät, Leybold-Heraeus GT-2
- Membranfilter Millex-GV Unit 0,22 µg (Millipore)

3.7.2 Methodik

3.7.2.1 Aufbereitung des Ascites

Vor der Fällung des Ascites wurde eine Antikörpertiterbestimmung wie unter 3.4.2.1 beschrieben durchgeführt. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von LOWRY (1951) vor und nach der Fällung ermittelt.

Einem Volumen Ascites wurde das gleiche Volumen 70 %iger Ammoniumsulfatlösung langsam zugegeben und auf Eis für eine Stunde stehen gelassen. Anschließend wurde 20 min mit 3000 U/min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, verworfen und der Rückstand mit aqua dest. auf das Originalvolumen aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde drei Tage gegen 2 x 5 l PBS dialysiert. Die Kontrolle des Außendialysats auf die Freiheit an Sulfationen erfolgte mit einer gesättigten BaCl₂-Lösung unter Ansäuerung mit 5 mol /l HCl. Vor der Gefriertrocknung, wurde der aufbereitete Ascites steril filtriert.

3.7.2.2 Bestimmung des IgG₁ Anteils des aufbereiteten Ascites

Mit dem aufbereiteten Ascites wurde eine IgG₁ Bestimmung durchgeführt. Hierzu wurde eine Microtiterplatte mit Kaninchen anti-Maus IgG (10 µg/ml) beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, ausgeschlagen und 30 min mit 3 % FCS/PBS abgesättigt. Die Platte wurde ausgeschlagen, dreimal gewaschen, und der aufbereitete Ascites (1:500 und 1:1000 in PBS verdünnt) sowie ein IgG₁ Standard (15 µg/ml) zupipetiert und in der Platte 1:3 in PBS weiterverdünnt. Nach einer Stunde wurde die Platte erneut gewaschen, ausgeschlagen und IgG₁-HRP (1:2000 in 1 % FCS/PBS) für eine Stunde aufgetragen. Substratzugabe, Abstoppen und Messung erfolgten wie unter 3.4.2.1 beschrieben.

3.7.2.3 Ergebnisse

Die Antikörperbestimmung des ungefällten Ascites im ELISA ergab einen Titer von 1:250.000. Der Proteingehalt nach LOWRY (1951) betrug 30 mg/ml vor und 12 mg/ml nach der Fällung. Der Vergleich mit der Standardkurve ergab einen IgG₁ Gehalt des aufbereiteten Ascites von 10 mg/ml.

Die von HACK ermittelten Kreuzreaktionen des monoklonalen Antikörpers mit anderen Trichothecen sind in Tab.13 aufgeführt.

3.7.2.4 Neutralisationstest des monoklonalen Antikörper

Die Prüfung des Toxinbindungsvermögens des monoklonalen Antikörpers erfolgte durch einen in-vivo-Versuch. Der wie unter 3.5.2.1 beschrieben aufbereitete Antikörper wurde in pyrogenfreien aqua ad injectabilia so gelöst, daß in 1 ml 30 mg enthalten waren. DAS wurde auf der Analysenwaage abgewogen, in Ethanol (1:40) gelöst und mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung so eingestellt, daß die LD₉₀ (11,26 mg DAS/KGW) in 250 µl enthalten war. Die so hergestellte Toxinlösung wurde steril filtriert und 1 ml Toxinlösung mit 1 ml des monoklonalen

Antikörper zusammengegeben. Dieses Gemisch wurde 3 h bei 37° C inkubiert. Je 500 µl dieses inkubierten Probenansatzes wurden vier Mäusen intravenös injiziert. Für eine Kontrollgruppe (4 Tiere) wurden je 1 ml der Toxinlösung mit 1 ml eines monoklonalen Kontrollantikörpers, der nicht gegen DAS gerichtet war, verabreicht. Sterile Filtration, Inkubation und Applikation erfolgte wie vorher bei der Versuchstiergruppe.

3.7.2.5 Passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper und nachfolgende intravenöse Belastung

Insgesamt 40 Tiere wurden passiv immunisiert und erhielten die LD₉₀ an DAS intravenös. Der monoklonale Antikörper wurde wie im Neutralisationsversuch gelöst (30 mg/ml) und je 500 µl intravenös appliziert. Umgerechnet auf das Molekulargewicht von DAS und von IgG wurden somit 8,3 % einer äquimolaren Menge verabreicht. Die Toxinapplikation erfolgte zwei Stunden später mit je 250 µl des Toxinstandards aus dem Neutralisationsversuches.

3.7.2.6 Ergebnisse

3.7.2.6.1 Neutralisationstest des monoklonalen Antikörpers

Drei der Kontrolltiere starben 12 - 16 Stunden nach der Toxinapplikation. Ein Kontrolltier mußte nach 20 Stunden somnolent euthanasiert werden.

Die Tiere der Versuchstiergruppe zeigten bei gleichbleibendem Allgemeinbefinden, normaler Futter- und Trinkwasseraufnahme keine Anzeichen einer Intoxikation.

3.7.2.6.2 Passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper und nachfolgende intravenöse Belastung

Zwölf (30 %) der mit DAS behandelten Tiere überlebten die intravenöse Toxinbelastung.

Tabelle 13: Spezifität des monoklonalen anti-DAS Antikörpers
(nach HACK 1988))

Toxin	50 % Hemmung ^a (µg/ml)	relative ^b Kreuzreaktivität (%)
Diacetoxyscirpenol	0.218	100.0
Diacetylverrucarol	0.406	53.7
Neosolaniol	1.57	13.9
T-2 Tetraol-		
tetraacetat	2.36	9.2
Fusarenon X	3.39	6.4
T 2 Toxin	12.9	1.7
HT-2	37.7	0.6
15-Acetoxyscirpenol	61.7	0.35
Scirpentriol	> 177.2	< 0.12
3 -Acetyldeoxynivalenol	> 147.9	< 0.15
Nivalenol	> 160.2	< 0.14
T-2 tetraol	> 167.7	< 0.13
Roridin A	> 93.9	< 0.23

^a Konzentration verschiedener Trichothecene (µmol/l) für eine 50% Hemmung

^b Kreuzreaktivität relativ zu Roridin A (Roridin A-Konzentration für 50% Hemmung/Toxinkonzentration für 50% Hemmung) x 100

3.8 Schutzwirkung der aktiven Immunisierung gegen DAS gegenüber Hauteinwirkung des Toxins

3.8.1 Material

- Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen PbwDH-Meerschweinchen durchgeführt. Die Tiere stammten aus den med. Verzüchtierzuchten GmbH, Savo Ivanovas, Kisslegg/Allgäu.

Die Tiere erhielten pelletiertes Fertigfutter (Altromin) und Trinkwasser ad. libitum. Das Fertigfutter wurde auf Freisein von DAS untersucht.

- Enthaarungscreme Plica med. (Olivin Hamburg)
- Kaninchen anti-Meerschweinchen Immunglobuline (Dakopatts)
- Meerschweinchen normal Serum (Dakopatts)
- gebogene Drahtöse
- Kanülen 0,7 x 30 mm
- Aceton p.a. Merck Darmstadt
- Variopipette: 10 - 100 µl (Eppendorf)

3.8.2 Methodik

Nach UENO (1969) erweisen sich Meerschweinchen in Hauttests mit Trichothecen als empfindlichste Labortiere (siehe 2.3.4 und Tab. 7).

Die Reproduzierbarkeit des Hauttests mit DAS wurde zunächst an zwei nicht immunisierten Meerschweinchen überprüft. Die Versuchstiere wurden geschoren, deren Rücken angefeuchtet und anschließend die Enthaarungscreme aufgetragen. Nach zehnminütiger Einwirkungszeit wurde der Meerschweinchenrücken mit einem Plastikspatel abgeschabt, das enthaarte Rückenfeld mit lauwarmen Wasser abgewaschen und anschließend abgetrocknet.

Ein in Aceton gelöster Toxinstandard (1 mg/ml DAS) wurde zweimal in Zehnerschritten verdünnt. Je 10 µl aus dieser Verdünnungsreihe wurden zusammen mit einem Leerwert des Lösungsvermittlers Aceton mit Hilfe einer Pipette und einer gebogenen Drahtöse auf den Meerschweinchenrücken aufgetupft. In einer Reihe parallel dazu wurde die gleiche Menge aufgetragen.

Nach etwa 12 h konnte eine deutliche, nicht scharf abgegrenzte, ca. 5 -Pfennigstück große Rötung an den mit 10 µg und mit 1 µg/Spot betupften Stelle beobachtet werden. Nach etwa weiteren 10 h rötete sich auch die mit 0,1 µg betupfte Stelle.

Zwei Meerschweinchen wurden aktiv mit je 100 µg DAS-HG-HSA suspendiert in komplettem Freund'schen Adjuvans, immunisiert. Die Antigenapplikation erfolgte subcutan in der Nähe des Buglymphknoten. Bei der vier Wochen nach der Grundimmunisierung durchgeführten Restimulierung wurde das Antigen in inkomplettem Freund'schen Adjuvans suspendiert. Die Blutentnahme zur Antikörpertiterbestimmung erfolgte aus der cranialen Hohlvene. Die Antikörpertiterbestimmung erfolgte mittels Doppel-Antikörper-Technik im ELISA wie unter 3.4.2.1 beschrieben. Anstelle des Kaninchen-anti-Maus IgG erfolgte die Grundbeschichtung der Platten mit Kaninchen anti-Meerschweinchen Immungobulin in Carbonat-Bicarbonatpuffer (100 µl/Kavität; 10 µg/ml). Es wurde für beide Meerschweinchen ein Antikörpertiter von 1:7.290 ermittelt.

Der Hauttest zur Prüfung der Schutzwirkung der aktiven Immunisierung wurde gleichzeitig an den beiden immunisierten und zwei nicht immunisierten Meerschweinchen durchgeführt.

3.8.3 Ergebnisse

Die Kontrolltiere zeigten, wie im oben beschriebenen Versuch, an den mit 10 μg und mit 1 μg betupften Hautstellen nach etwa 12 h Hautrötungen. Der mit 0,1 μg betupfte Spot rötete sich nach weiteren 10 h.

Die Hautreaktion bei den gegen DAS immunisierten Tieren trat an den mit 10 μg und 1 μg betupften Hautstellen nach etwa 20 h auf. Die Rötungen waren gegenüber denen der Kontrolltiere deutlich abgeschwächt. An den mit 0,1 μg betupften Hautstellen zeigte sich bei den immunisierten Tieren auch nach längerer Zeit keine Hautrötung.

4 Diskussion

Trichothecene - darunter DAS - gehören zu besonders wirkungsvollen Mykotoxinen, die von Fusarienarten im Getreide gebildet werden. Seit ihrer Entdeckung mehren sich die Berichte über Schäden in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung, die durch Aufnahme von trichothecenhaltigen Futtermitteln verursacht werden. Darüber hinaus besteht die Gefahr, daß sie mit Lebensmitteln, die aus Zerealien oder unter deren Zusatz hergestellt werden, auch von Menschen verzehrt werden.

Mit Trichothecen kontaminiertes Getreide kann über den Hautkontakt bei Landarbeitern von einer lokalen Reizung bis zur Hautnekrose führen (KEMMPAINEN et al. 1984).

Neben der Entwicklung empfindlicher Nachweismethoden für diese Substanzen müssen deshalb auch Überlegungen zum Schutz gegen Trichothecene stehen. Da am Institut im Rahmen anderer Forschungsvorhaben seit längerem Immunogene zur Produktion von Antiseren für diagnostische Untersuchungen hergestellt werden, bot es sich an, die entsprechenden Immunogene zur aktiven und gewonnenen Antiseren zur passiven Immunisierung einzusetzen, um die Schutzwirkung dieser Behandlungsmöglichkeit zu prüfen. Ein am Institut entwickelter, gegen DAS gerichteter, monoklonaler Antikörper konnte in diese Untersuchungen einbezogen werden. Ob eine durch aktive Immunisierung erzeugte Abwehrbereitschaft die Haut miteinbezieht, wurde an immunisierten Meerschweinchen geprüft, zumal sich nach UENO (1970) Meerschweinchen für Hauttests mit Trichothecen als empfindlichste Labortiere erwiesen.

Die natürliche Aufnahme des Toxins findet auf oralem Weg über kontaminierte Nahrungsmittel statt. Da sich in der einschlägigen Literatur nach dem neuesten Stand keine Hinweise auf Toxizitätswerte bei einer oralen Verabreichung von DAS an Mäuse fanden, wurden diese für eine spätere Überprüfung des Immunschutzes ermittelt. Für die Prüfung des durch passive Immunisierung

erzeugten Immunschutzes durch die intravenöse Toxinapplikation mußten die entsprechenden Werte ebenfalls ermittelt werden. Die Ermittlung der Toxizität erfolgte mit Hilfe der Probitanalyse und ergab für die orale Verabreichung von DAS an weibl. NMRI Mäuse eine LD_{50} von 8,32 mg DAS/kg KGW. Für eine intravenöse Applikation wurde eine LD_{50} von 7,02 mg DAS/kg KGW festgestellt. Die dabei gemachten Erfahrungen hinsichtlich der klinischen Befunde und der pathologisch-anatomischen Veränderungen glichen denen anderer Untersucher (KRIEGLEDER, 1980; CHI und MIROCHA 1978; WEAVER et al. 1981; HOERR et al. 1981; 1982 a,b ; BÖHM, 1987). Die erhobenen Befunde sprechen für ein perakutes toxisches Geschehen, wobei der Schwerpunkt der durch DAS herbeigeführten Veränderungen im Verdauungstrakt liegt.

Die Beobachtung der Tiere nach der Belastung ergab in allen Versuchen vergleichbare Ergebnisse: In den ersten Stunden nach der Toxinapplikation keinerlei besondere klinische Symptome bei normaler Futter- und Trinkwasseraufnahme. Später zunehmend verschlechtertes Allgemeinbefinden, gesträubtes Haarkleid, Apathie und Lähmungserscheinungen.

Bei den zur Immunität der Haut durchgeführten Untersuchungen, wurde zunächst bei nicht immunisierten Tieren die Reproduzierbarkeit der von UENO (1977) angestellten Untersuchungen überprüft. Die Nachweisgrenze des auf die Meerschweinchenhaut aufgetupften in Aceton gelösten DAS lag mit 0,1 µg pro Spot sogar noch unter dem von UENO (1977) ermitteltem Wert von 0,2 µg.

DAS besitzt wegen seines geringen Molekulargewichtes keine immunogenen Eigenschaften. Es muß deshalb vor der Immunisierung an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Die Hydroxylgruppe am C-3-Atom des DAS Moleküls eignet sich zur Bindung mit einer reaktiven Gruppe. Zur Einführung einer Carboxylgruppe in das Toxinmolekül wurde nach der Methode von CHU et al. (1984) Glutarsäureanhydrid verwendet (DAS-HG). Die Kopplung des so gewonnenen DAS-HG an Humanserumalbumin (HSA) erfolgte nach der Carbodiimid-Methode von CHU et al. (1979).

Ein bereits mit Bernsteinsäureanhydrid hergestelltes DAS-Hemisuccinat (DAS-HS), das mit der Carbodiimid-Methode an HSA gekoppelt worden war, wurde im Vorversuch (3.4.) hinsichtlich seiner Verwendungsfähigkeit zur aktiven Immunisierung untersucht, um das geeignetere der beiden DAS-Derivate zu ermitteln. Die aktive Immunisierung der Versuchstiere zeigte einige interessante Resultate. So konnte die Feststellung von CHU et al. (1984) bestätigt werden, daß das DAS-HG-Derivat ein besseres Immunogen als das DAS-HS-Derivat darstellt.

DAS-HS-HSA konnte trotz dreimaliger Restimulierung keine Bildung spezifischer Antikörper induzieren. Diese Erfahrung hat auch KLAFFER (1988) gemacht. Der Grund für die mangelnde Immunogenität des DAS-HS-HSA liegt nach CHU et al. (1984) in seiner mangelnden Stabilität. Zusätzlich findet während des Immunisierungsvorganges eine "in-vivo-Hydrolyse" der Esterbindung statt, so daß es zu einem Zerfall in DAS und Succinatderivate kommt (CHU et al., 1984). Die immunsuppressiven Eigenschaften von DAS (siehe 2.4), sowie die darauf einsetzende schnelle Metabolisierung des Toxins (siehe 2.5) verhindern dann die Stimulierung der immunkompetenten Zellen und eine Antikörperproduktion.

Mit DAS-HG-HSA konnte dagegen bei i.p. Applikation des Antigens sowohl im Vor- als auch im Hauptversuch eine Antikörperproduktion angeregt werden. Dies wird von CHU et al. (1984) auf die um eine CH_2 -Gruppe längere Kohlenwasserstoffbrücke zwischen DAS und HSA zurückgeführt.

Die bereits erwähnte Immunsuppression von DAS ist vermutlich auch dafür verantwortlich, daß bei 34,5 % der Tiere des Hauptversuches trotz dreimaliger Restimulierung keine Immunantwort erzielt werden konnte. Auch der Rückgang eines bereits nachgewiesenen Antikörpertiters nach erneuter Restimulierung bei 14,5 % der Tiere dürfte darauf zurückzuführen sein, daß ein geringer Teil DAS vom Antigen abgespalten wird, welcher nun immunsuppressiv wirken kann.

Daß 47,2 % der Tiere nach der dritten Restimulierung Antikörpertiter über 1:21.870 aufwiesen, lag vermutlich daran, daß das Abwehrsystem der Versuchstiere auf den immunsuppressiven Effekt von DAS sehr unterschiedlich reagierte.

Bei den Untersuchungen zur Ermittlung der Empfindlichkeit der Antiseren (3.3.2.8) zeigte sich, daß auch bei Tieren, die spezifische Antikörper gleicher Titerhöhe bildeten, diese nicht in gleichem Maße in der Lage waren, das Toxin zu binden.

Zur Überprüfung des Immunschutzes wurden die aktiv immunisierten Tiere aus Vor- und Hauptversuch einer oralen Toxinexposition unterzogen. Die Tiere aus dem Vorversuch wurden mit der LD_{90} (10,62 mg DAS/kg KGW) belastet. Hierbei konnte keine Schutzwirkung nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden die im Hauptversuch immunisierten Tiere nur mit der LD_{50} (8,32 mg DAS/kg KGW) belastet. Es zeigte sich, daß auch Tiere mit guter Antikörperbildung einer nur geringen Toxinbelastung nicht standhielten. Für die passive Immunisierung wurde Kaninchen-anti-DAS-Serum affinitätschromatographisch gereinigt. Im Anschluß wurden Tiere passiv intravenös über die Schwanzvene immunisiert und zwei Stunden später oral mit der LD_{90} belastet. Diese Tiere starben im gleichen Zeitraum, wie nicht immunisierte Kontrolltiere.

Für die Unwirksamkeit der aktiven oder passiven Immunisierung bei oraler Verabreichung von DAS kommen folgende Erklärungen in Betracht: Im Organismus werden bei oraler Toxinaufnahme durch Deacetylierung schnell Metaboliten gebildet. BAUER et al. (1985 a,b) wiesen bereits eine halbe Stunde nach oraler DAS Gabe an Schweine im Serum die Trichothecene Monoacetoxy-scirpenol (MAS) und Scirpentriol (SCT) nach. MAS konnte bereits im Erbrochenen von Tieren festgestellt werden. BAUER (1986) vermutet als mögliche Ursache für diese präsystemische gastrale Transformation sowohl den niedrigen pH-Wert als auch die Aktivität hydrolytischer Enzyme des Magensaftes.

Für die Toxizität des DAS-Metaboliten MAS fand sich in Literatur nur ein Hinweis. So stellten MIROCHA et al. (1985) bei oraler Verabreichung von MAS an Ratten fest, daß die LD_{50} nur um 0,2 mg geringer als die von DAS war. Für SCT liegen keine Literaturangaben vor.

Da die Bildung der Metaboliten sehr schnell erfolgt, können spezifisch gegen DAS gerichtete Antikörper keinen Schutz bewirken, zumal die Kreuzreaktion des Anti-DAS-Serums im simultanen und konsekutiven ELISA für MAS nur 1,5 % und für SCT 0,0032 %

betrug (KLAFFER 1988); (siehe Tab.12). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Acetylgruppe an der C-4-Position (R-2; siehe Abb.1). Ein Verlust dieser Gruppe, wie er bei der Umwandlung von DAS zu 15-MAS erfolgt, führt zu dem erwähnten fast vollständigen Abfall der Toxinbindungskapazität durch den Antikörper. Der gegen DAS gerichtete Antikörper ist dann nicht mehr in der Lage, ein Trichothecen, das sich durch den Verlust dieser Gruppe von DAS unterscheidet, zu erkennen.

Durch die Wirkung von 12,13-Epoxytrichothecene - wie DAS - wird der Verdauungstrakt am meisten betroffen. Es war deshalb von Interesse festzustellen, ob durch die aktive Immunisierung ein Schutz erreicht wurde, der eventuell durch den Gehalt der Schleimhaut an IgA-Antikörpern angezeigt wird. IgA-Antikörper konnten zwar nachgewiesen werden. Es konnte aber nicht festgestellt werden, daß diese Antikörper in der Lage waren, das Toxin in vitro zu binden.

Mit einer intravenösen Toxinapplikation sollten durch Umgehung des Abbaus von DAS im Magendarmtrakts, der bei oraler Verabreichung eine hohe Metabolisierungsrate bewirkt, Voraussetzungen geschaffen werden, daß Antikörper und nicht enteral verstoffwechseltes DAS miteinander reagieren konnten.

Zehn Versuchstiere wurden zwei Stunden nach einer passiven Immunisierung mit der LD₉₀ intravenös belastet. Da in dieser Gruppe acht Tiere überlebten, konnte so mit affinitätschromatographisch aufbereitetem DAS-Antiserum ein deutlicher Schutzeffekt erzielt werden. Ob dieser Schutzeffekt durch Erhöhung der Antikörper zu verbessern ist, müßte in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Einen Schutzeffekt zeigte auch der monoklonale Antikörper. Die hierbei erzielte 30% ige Überlebensrate ist allerdings durch die höhere Versuchstierzahl besser abgesichert. Die Erklärung dafür, daß auch mit dem monoklonalen Antikörper kein 100%iger Schutz erzielt werden konnte, liegt vermutlich in der Tatsache begründet, daß DAS in der Leber nach intravenöser Applikation rasch verstoffwechselt wird. So untersuchten OTHA et al. (1978) von sieben Trichothecen der Gruppe A die

Deacetylierungsgeschwindigkeiten am C-4-Atom durch mikrosomale, unspezifische Carboxyesterasen von Kaninchen- und Rattenlebern. Dabei zeigte sich, daß DAS die höchste Umsatzrate besitzt. Bei einer der Toxinapplikation vorausgegangenen passiven Immunisierung wird jedoch zweifellos ein Teil des Toxins vor der Metabolisierung bei der Leberpassage durch den Antikörper neutralisiert.

Die Beobachtungen beim Meerschweinchenhauttest an gegen DAS immunisierten Tieren sprechen ebenfalls für einen gewissen Immunschutz der Haut gegen Trichothecene. Da auf die Haut getupftes DAS nicht oder nur zu einem geringen Anteil metabolisiert werden dürfte, konnte zumindest bei höheren Konzentrationen eine Verzögerung und Abschwächung und in der geringsten Dosierung auch ein Ausbleiben der Hautreaktion festgestellt werden. Die Aussagekraft dieses Versuchs ist allerdings auch angesichts der geringen Versuchstierzahl zu werten.

Die in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen bestätigen bisherige orientierende Untersuchungen (FEUERSTEIN et al., 1985; BÖHM 1987), daß ein immunologisch induzierter Schutz gegen Trichothecene grundsätzlich möglich ist. Eine aktive Immunisierung mit einem an einer anderen Seitenkette des DAS-Moleküls gekoppelten Proteinträger könnte eine Antikörperproduktion induzieren, die auch gegen die Metaboliten MAS und SCT gerichtet ist. Dadurch könnte ein Schutz auch gegen eine orale Belastung bewirkt werden.

Für die passive Immunisierung wäre ein Antiserum sinnvoll, das sowohl mit dem Toxin als auch den zu erwartenden Metaboliten gleich gut reagiert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des Trichothecens Diacetoxyscirpenol (DAS) untersucht, inwieweit eine aktive bzw. passive Immunisierung gegen dieses Mykotoxin möglich ist. Von zwei bereits vorhandenen Antigenen DAS-Hemisuccinat-Humanserumalbumin (DAS-HS-HSA) und DAS-Hemiglutarat-Humanserumalbumin (DAS-HG-HSA) konnte DAS-HS-HSA keine Antikörperproduktion induzieren. Für den Hauptversuch wurde daher DAS-HG-HSA hergestellt. Der Erfolg der Antigenverabreichung wurde in vitro mittels ELISA und in vivo durch orale DAS-Belastung der Tiere überprüft. Da entsprechende Toxizitätswerte in der Literatur fehlten, wurden diese sowohl für orale als auch für intravenöse Belastungsversuche ermittelt. Die mittels der Probitanalyse ermittelten Werte betragen bei oraler DAS-Applikation an weibl. NMRI-Mäuse 8,32 mg DAS/kg KGW und bei intravenöser 7,02 mg DAS/kg KGW.

Die passive Immunisierung der Tiere wurde mit affinitätschromatographisch aufbereitetem Kaninchen-anti-DAS-Serum und einem monoklonalen gegen DAS gerichteten Antikörper durchgeführt. Weder aktiv noch passiv immunisierte Tiere konnten einer oralen Toxinexposition standhalten. Der Grund hierfür dürfte in der hohen Metabolisierungsrate von DAS bei oraler Verabreichung liegen. Mit den dabei entstehenden Metaboliten reagieren die geprüften Antikörper in vitro nur in sehr geringem Maße.

Bei einer passiven Immunisierung mit einer nachfolgenden intravenösen Toxinbelastung waren sowohl heterologes Antiserum als auch der monoklonale Antikörper in der Lage, DAS zu binden und einen gewissen Schutz zu bewirken. Dabei dürfte ein Teil des Toxins vor der Metabolisierung durch den Antikörper gebunden worden sein.

Aktiv gegen DAS immunisierte Meerschweinchen zeigten bei einem Hauttest gegenüber nicht immunisierten Kontrolltieren eine verzögerte und abgeschwächte Reaktion bei Einwirkung von DAS auf die Haut.

Summary

Examinations on the possibility of immunization against trichothecenes by diacetoxyscirpenol

From the two already available antigens DAS-hemisuccinat-human-serumalbumin (DAS-HS-HSA) and DAS-hemiglutarat-human-serumalbumin (DAS-HG-HSA) the first one was not able to induce any antibody production. Therefore for the main experiment only DAS-HG-HSA was produced.

The result of the antigen administration was tested in vitro by ELISA and in vivo by oral DAS-challenge of the animals. As corresponding toxic values could not be found in the literature, they had to be determined for oral as well as for intravenous challenges. The values determined by probit analysis after DAS-administration to female NMRI-mice showed 8.32 mg DAS/kg after oral and 7.02 mg DAS/kg after intravenous application.

The passive immunization of the animals was carried through with an affinity purified rabbit-anti-DAS-serum and a monoclonal antibody directed against DAS. Neither actively nor passively immunized animals could resist to an oral toxin exposition. This may be due to the high metabolic rate of DAS when administered orally. The antibodies tested in vitro react with the resulting metabolites only to a small extent.

With passive vaccination and the following intravenous toxin application the heterologous antiserum as well as the monoclonal antibody are able to bind DAS and cause a certain protection. Parts of the toxin might have been bound by the antibody before being metabolized.

In a skin test actively immunized guinea-pigs showed a delayed and weakened reaction when treated with DAS compared with not immunized animals.

6 Literatur

- ALLEN, N.K., R.L. JEVNE, C.J. MIROCHA und Y.W. LEE (1982):
The effect of *Fusarium roseum* culture and diacetoxyscirpenol on
reproduction of Withe Leghorn females
Poultry Sci. 61, 2172-2175
- BAMBURG, J.R., F.M. STRONG und E.B. SMALLEY (1969):
Toxin from moldy cereals
J. Agr. Food Chem. 17, 443-450
- BAMBURG, J. R. und F.M. STRONG (1971):
12,13-Epoxytrichothecenes
In: KADIS S., A. CIEGLER und S.J. AJL. Academic Press New York
Vol. 7, 207-292
- BARNIKOL, H.S., A. GRUBER, A. THALMANN und H.L. SCHMIDT (1982):
Fusariotoxikosen beim Schwein durch Trichothecene mit Beteiligung
von Mutterkorn
Tierärztl. Umschau 37, 114-126
- BAUER, J., M. GAREIS, C.ENDERS und B.GEDEK (1985 a):
Comparative study on the metabolism of diacetoxyscirpenol and
zearalenone in pigs
6. INTERN. IUPAC Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins, Pretoria,
Republic of South Afrika, 22.-25.Juli 1985 Abstr. p.43
- BAUER, J., W. BOLLWAHN, M. GAREIS, B. GEDEK und K. HEINRITZI
(1985 b):
Kinetic profiles of diacetoxyscirpenol and two of its metabolites
in blood serum of pigs
Appl. Environ. Microbiol. 49, 842-845

BAUER, J. (1980):

Zur Leistungsfähigkeit mykotoxikologischer Untersuchungsmethoden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 354-359

BAUER, J. (1986):

Untersuchungen zum Nachweis, Metabolismus und Carry over von
Mykotoxinen

Habil. med. vet. München

BIERMANN, A. und G. TERPLAN (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA

Arch. Lebensmittelhyg, 31, 51- 57

BÖHM, M. (1987):

Untersuchungen zur Möglichkeit einer Immunisierung gegen
Mykotoxine am Beispiel von T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol

Diss. med. vet. München

BRIAN, P.W., A. W. DAWKINS, J.F. GROVE, H.G. HEMMING, D. LOWE und
G.L.F. NORRIS (1961):

Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*

J. Exp. Bot. 12, 1-12

BULLER, R.S. (1983):

The effect of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on the immune
system of the mouse

Ph.D., University of Montana, Michigan, p. 116-144

BURMEISTER, H.R., R.F. VESONDER und W.F. KWOLEK (1980):

Mouse bioassay for *Fusarium* metabolites: Rejection or acceptance
when dissolved in drinking water

Appl. Environ. Microbiol. 39, 957-961

CAVALLI-SFORZA, L. (1980):

Biometrie, Grundzüge biolog.- med. Statistik

5.Auflage

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

CHI, M. S. und C.J. MIROCHA (1978):

Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and crotoxin

Poultry Sci. 57, 807-808

CHI, M.S., T.S. ROBISON, C.J. MIROCHA und K.R. REDDY (1978):

Acute toxicity of 12,13-epoxytrichothecenes in one-day-old broiler chicks

Appl. Environ. Microbiol. 35, 636-640

CHU, F.S (1986):

Recent studies on immunochemical analysis of mycotoxin

In: STEYN, P.S. und R. VLEGGAR: Mycotoxins and phycotoxins. A collection of invited papers presented at the Sixth International IUPAC symposium on mycotoxins and phytotoxins, Pretoria, Republic of South Africa, 22-25 July 1985,

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

CHU, F.S., M.Y. CHEN LIANG und G.S. ZHANG (1984):

Production and characterization of antibody against diacetoxyscirpenol

Appl. Environ. Microbiol. 48, 777-780

CHU, F.S., S. GROSSMAN, R.-D. WEI und C.J. MIROCHA (1979):

Production of antibody against T-2 toxin

Appl. Environ. Microbiol. 37, 104-108

CUNDLIFF, E., M. CANNON und J. DAVIES (1974):

Mechanism of inhibition of eucaryotic protein synthesis by trichothecenes fungal toxins

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 30-34

EPPLEY, R. M. (1974):

Sensitivity of brine shrimp (*Artemia salina*) to trichothecenes

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 87, 618-620

ESGIN, S. (1987):

Erstellung und Anwendung eines enzymimmunologischen Verfahrens
zum Nachweis von T2- Toxin

Diss. med. vet. München

FEUERSTEIN, G., J.A. POWELL, A.T. KNOWER und K.W. HUNTER (1985):

Monoclonal antibodies to T-2 Toxin

In vitro neutralization of protein synthesis inhibition and
protection of rats against lethal toxemia

J. Clin. Invest. 76, 2134-2138

FREEMAN, G.G. und R.J. MORRISON (1948):

Trichothecin: an antifungal metabolic product of *Trichothecium*
roseum Link

Nature 162, 30

GAREIS, M. (1982):

Untersuchungen zum gaschromatographischen Nachweis und zur
Bildung von Trichothecenen

Diss. med. vet. München

GEDEK, B. (1972):

Biologischer Nachweis von Mykotoxinen

Zbl. Vet. Med. B, 19, 15-32

GODTFREDSEN, W.O., J.F. GROVE und CH. TAMM (1967):

Zur Nomenklatur einer neuen Klasse von Sesquiterpenen

Helv. Chim. Acta 50, 1666

HACK, R. (1988)

Persönliche Mitteilung

HAYES M.A. und H.B. SCHIEFER (1979):

Quantitative and morphological aspects of cutaneous irritations
by trichothecene mycotoxins

Fd. Cosmet. Toxicol. 17, 611-623

HEBERT, G.A., P.L. PELHAM und B. PITTMAN (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera
Appl. Microbiol. 25, 26-36

HOERR, F.J., W.W. CARLTON und B. YAGEN (1981):

Mycotoxycosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens
Vet. Path. 18, 652- 664

HOERR, F.J., W.W. CARLTON, B. YAGEN und A.Z. JOFFE (1982 a):

Mycotoxycosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol
Avian Pathology 11, 369-383

HOERR, F.J., W.W. CHARLTON, B. YAGEN und A.Z. JOFFE (1982 b):

Mycotoxycosis caused either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in the diet of broiler chickens
Fundam. Appl. Toxicol. 2, 121-124

HURN, B.A.L. und S.M. CHANTLER (1980):

Production of reagent antibodies
Meth. Enzymol. 70, 104-142

HSU, J.-CH., E.B. SMALLEY, F.M. STRONG und W.E. RIBELIN (1972):

Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle
Appl. Microbiol. 24, 684-690

JAMES, G.T. (1978):

Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers
Anal. Biochem. 86, 574-579

KEMPPAINEN, B.W., R.T. RILEY und J.G. PACE (1984):

Penetration of [^3H] T-2 Toxin through excised human and guinea-pig skin during exposure to [^3H] T-2 Toxin adsorbed to corn dust
Fd. Chem. Toxicol. 22, 893-896

KIESSLING, K-H. , H. PETERSSON, K. SANDHOLM und M. OLSEN (1984):
Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria

Appl. Environ. Microbiol. 47, 1070-1073

KLAFFER, U. (1988)

Entwicklung und Anwendung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für Diacetoxyscirpenol
Diss. med. vet. München

KLAFFER U., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1988):

Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of diacetoxyscirpenol
Int. J. Food Microbiol. 6, 9-17

KRIEGLEDER, H. (1980):

Morphologische Befunde beim Meerschweinchen nach Verabreichung der Trichothecene Diacetoxyscirpenol und T-2 Toxin
Diss. med. vet. München

LIAO, L.L., A. GROLLMANN und S. HORWITZ (1976):

Mechanism of action of 12,13-epoxytrichothecenes anguidin an inhibitor of protein synthesis
Biochem. Biophys. Acta 454, 273-284

LINDENFELSER, L.A., E.B. LILLEHOJ und H.R. BURMEISTER (1974):

Aflatoxin and trichothecene toxins: Skin tumor induction and synergistic acute toxicity in white mice
J. Natl. Canc. Inst. 52, 113-116

LOEFFLER, W., R. MAULI, M.E. RUESCH und H. STÄHELIN (1965):
Anguidin and derivatives, new antibiotic and antitumoral products
Chem. Abstr. 62, 5856

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):
Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis
von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver
Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1986):
Development of enzyme immunoassays for analysis of mycotoxins
Proceedings of 2nd World Congress Foodborne Infections and
Intoxications, Berlin, Mai 1985, p. 920-923

MÄRTLBAUER, E., M. GAREIS und G. TERPLAN (1988):
Enzyme immunoassay for the macrocyclic trichothecene Roridin A:
Production, properties, and use of rabbit antibodies
Appl. Environ. Microbiol. 54, 225-230

MARASAS, W.F.O., J.R. BAMBURG, E.B. SMALLEY, F.M. STRONG,
W.L. RAGLAND und P.E. DEGRUSE (1969):
Toxic effects on trout, rats and mice of T-2 toxin produced by
the fungus *Fusarium tricinctum*
Tox. Appl. Pharm. 15, 471-482

McLAUGHLIN, C.S., M.H. VAUGHAN, I.M. CAMBELL, C.M. WEI,
M.E. STAFFORD und B.S. HANSEN (1977):
Inhibition of protein synthesis by trichothecenes
In: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN
Mycotoxins in human and animal health, p.263-273
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

MIROCHA, C.J. (1983):

Effect of trichothecene mycotoxins on farm animals

In: UENO, Y.: Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects

Developments in food science, Vol. 4, p. 177-194

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

MIROCHA, C.J., R.J. PAWLOWSKY, Z. TONG-XIA und Y.-W. LEE (1985):

Chemistry and biological activity of Fusarium roseum mycotoxins

In: LACEY, J. Trichothecenes and other mycotoxins

John Wiley, Chichester p.291-305

NIESCHLAG, E., H.K. KLEY und K.-H. USADEL (1975):

Production of steroid antisera in rabbits

In: CAMERON, E.D.H., S.G. HILIER und K.GRIFFITH:

Proceedings of the 5th Tenovus Workshop,

Cardiff, April 1974

Alpha Omega Publ., Cardiff, p. 87-96

OHATA, M., H. MATSUMOTO, K. ISHHII und Y.UENO (1978):

Metabolism of trichothecene mycotoxins. II. Substrate specificity of microsomal deacetylation of trichothecenes

J. Biochem. 84, 697-706

PATHRE, S.V. und C.J. MIROCHA (1977):

Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence

In: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN:

Mycotoxins in human and animal health, p. 229-253

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

ROSENSTEIN, Y., R. KRETSCHMER und C. LAFARGE-FRAYSSINET (1981):

Effect of Fusarium toxins, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune responses

Immunology 44, 555-560

ROSENSTEIN, Y. und C. LAFARGE-FRASSINET (1983):
Inhibitory effect of Fusarium T-2 toxin on lymphoid DNA and
protein synthesis

Tox. Appl. Pharm. 70, 283-288

SAITO, M. und K. OTSUBO (1974):
Trichothecene toxins of Fusarium species
In: Purchase, I.F.H.: Mycotoxins, p. 263
Elsevier Scientific Publishing Company

SIEGFRIED, R. (1977):
Fusarium-Toxine
Naturwissenschaften 64, 274

SIRIWARDANA, T.M.G. und P. LAFONT (1978):
New sensitive biological assay for 12,13-epoxytrichothecenes
Appl. Environ. Microbiol. 35, 206-207

SMALLEY, E.B. und F.M. STRONG (1974):
Toxic trichothecenes
In: Purchase, I.F.H.: Mycotoxins p. 199-288
Elsevier Scientific Publishing Company

STÄHELIN, H., M.E. KALBERER-RÜSCH, E. SIGNER und S. LAZARY
(1968):
Über einige biologische Wirkungen des Cytostatikums
Diacetoxyscirpenol
Arzneim. Forsch. 18, 989-944

UENO, Y. (1977a):
Mode of action of trichothecenes
Pure Appl. Chem. 49, 1737-1745

UENO, Y. (1977b):

Trichothecenes

In: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMANN:

Mycotoxins in human and animal health, p. 209-228

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

UENO, Y. (1980):

Trichothecene mycotoxins - mycology, chemistry and toxicology

In: DRAPER, H.H.: Advances in nutritional research, Vol. 3,

Plenum Publishing Corporation, New York p. 301-353

UENO, Y. (1983)

General toxicology

In: UENO, Y.: Trichothecenes - chemical, biological and
toxicological aspects

Developments in food science, Vol. 4, p. 135-194

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

UENO, Y. und K. FUKUSHIMA (1968):

Inhibition of protein and DNA synthesis in Ehrlich ascites tumor
cells by nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivinale*-
growing rice

Experientia 24, 1032-1033

UENO, Y. und H. YAMAKAWA (1970):

Antiprotozoal activity of scirpene mycotoxins of *Fusarium*
nivenole Fn 2B

Jap. J. Exp. Med. 40, 385-390

UENO, Y., M. HOSOYA und Y. ISHIKAWA (1969):

Inhibitory effects of mycotoxins on the protein synthesis in
rabbit reticulocytes

J. Biochem. 66, 419-422

UENO, Y., N. SATO, K. ISHII, K. SAKAI, H. TSUNODODA und M. ENOMOTO (1973):

Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species

Appl. Microbiol. 25, 699-704

UENO, Y., Y. ISHIKAWA, K. AMAKAI, M. NAKAJIMA, M. SAITO, M. ENOMOTO und K. OTHSUBO (1970):

Comparative study on skin-necrotizing effect of scirpene metabolites of *Fusaria*

Japan. J. Exp. Med. 40, 33-38

WEAVER, G.A., H.J. KURTZ und F.Y. BATES (1981):

Diacetoxyscirpenol toxicity in pigs

Res. Vet. Sci. 31, 131-135

WEAVER, G.A., H.J. KURTZ, C.J. MIROCHA, F.Y. BATES und J.C. BEHRENS (1978):

Acute toxicity of mycotoxin diacetoxyscirpenol in swine

Can. Vet. J. 19, 267-271

WEI, C. und L.S. McLAUGHLIN (1974):

Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes, novel inhibitors of protein synthesis

Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 838-844

WERMTER R. (1980):

Untersuchungen des Toxinbildungsvermögens in Futtermitteln vorkommender *Fusarien* mit physikalisch-chemischen und biologischen Methoden

Diss. med. vet. München

WISKOTT, U. (1978):

Untersuchungen über die immunsuppressive Wirksamkeit von *Fusarium*toxinen

Diss. med. vet. München

WORONOW, W. (1891):

Über das "Tauselgetreide in Süd-Ussurien"

Bot. Zeit. 49, 81-94

Bei Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Unterstützung bei Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Ulrich Klaffer bedanke ich mich für die vielen Anregungen. Ebenso danke ich Herrn Rüdiger Hack für die Anregungen und die Überlassung des monoklonalen Antikörpers.

Frau Gabriele Schaller möchte ich für ihre freundliche Mitarbeit danken.

Für eine erste Durchsicht dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Volker Renz.

Allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 24. Dezember 1953 wurde ich, Ernst Johann Gottlieb Hatz, als einziges Kind des Rechtsanwalts Dr. jur. Helmut Hatz und seiner Ehefrau Katharina, geborene Hartl, in München geboren.

In Gauting (Landkreis Starnberg) besuchte ich von 1960 - 1964 die Volksschule; und von 1964 - 1973 das humanistische Karlsgymnasium in München-Pasing.

Meinen Wehrdienst leistete ich vom 1.10.1973 - 31.12.1974 beim schweren Pionier Lehr- und Versuchsbataillon 210 in München.

Für das Sommersemester 1975 immatrikulierte ich mich für das juristische Studium an Universität München.

Nach Abbruch des Jurastudiums machte ich vom 1.9.76 - 31.10.77 eine Ausbildung als Facharbeiter für Stahlbetonbau bei der Firma Dyckerhoff und Widmann AG.

Vom Wintersemester 1977 an studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die tierärztliche Prüfung legte ich im Wintersemester 1984/85 ab und erhielt mit Wirkung vom 6. März 1985 die tierärztliche Approbation.

Seit 15.6.1986 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München tätig.

